

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI
FEDERICO II



DOTTORATO DI RICERCA IN INGEGNERIA CHIMICA DEI
MATERIALI E DELLA PRODUZIONE
XVIII CICLO

PROPRIETA' BIOLOGICHE DI MATERIALI PREPARATI CON LA
TECNICA SOL-GEL

Coordinatore

Prof. Nino Grizzuti

Tutor

Prof. Michelina Catauro

Candidata

Dott. Raucci Maria Grazia

ANNO ACCADEMICO 2004/2005

INDICE

INTRODUZIONE	pag.	4
---------------------	-------------	----------

CAPITOLO I: BIOMATERIALI

1.1 Classi di materiali	>>	6
1.2 Biomateriali	>>	6
1.3 Metodo di preparazione: tecnica sol-gel	>>	11
1.4 Biocompatibilità	>>	21
1.4.1 Biosicurezza	>>	22
1.4.2 Biofunzionalità	>>	24
1.5 Osteoblasti	>>	26
1.5.1 Osteoblasti in vitro	>>	26

CAPITOLO II: MATERIALI IBRIDI

2.1 Ibridi organo-inorganici	pag.	33
2.1.1 Ibridi di prima classe	>>	34
2.1.2 Ibridi di seconda classe	>>	42
2.2 Materiali polimerici	>>	46
2.3 Componente organica: PCL	>>	54
2.4 Componente inorganica: ZrO₂-TiO₂	>>	57

CAPITOLO III: SISTEMI A RILASCIO CONTROLLATO DI FARMACI

3.1 La tecnologia “Drug Delivery”	pag.	60
3.2 Terminologia appropriata del Drug Delivery	>>	62
3.3 Sistema a rilascio controllato di farmaci (SRC)	>>	62
3.4 Modelli dei sistemi a rilascio di farmaci	>>	65
3.4.1 Sistemi a Diffusione	>>	65
3.5 Polimeri utilizzati per un SRC	>>	69
3.6 Farmaci candidati per un SRC	>>	69
3.6.1 Farmaci utilizzati per il nostro SRC	>>	70

CAPITOLO IV: RISULTATI SPERIMENTALI

4.1 Sol-gel degli ibridi organo-inorganici	pag.	73
4.1.1 Sintesi sol-gel degli ibridi	>>	73
4.2 Meccanismo di formazione degli Ibridi	>>	79
4.3 Analisi dei diffrattogrammi XRD	>>	83
4.4 Analisi microstrutturale	>>	86
4.4.1 Microscopia elettronica a scansione (SEM)	>>	86
4.4.2 Microscopia a forza atomica (AFM)	>>	89
4.5 Bioattività	>>	94
4.5.1 Preparazione di SBF	>>	94
4.5.2 Test di bioattività	>>	94
4.6 Biocompatibilità	>>	99
4.6.1 Test di biocompatibilità	>>	99
4.6.2 MTT test	>>	100
4.6.3 Alamar Blue test	>>	124
4.6.4 Live/Dead test	>>	127
4.7 Studio sul rilascio utilizzando la spettroscopia UV-VIS	>>	136
CONCLUSIONI	>>	141

APPENDICE: TECNICHE STRUMENTALI UTILIZZATE

A.1 Spettroscopia infrarossa	pag.	143
A.2 Diffrazione raggi X	>>	146
A.3 Microscopia	>>	149
Bibliografia	>>	156

INTRODUZIONE

Il presente lavoro di tesi si basa sulla sintesi di materiali preparati con la tecnica sol-gel, in particolar modo lo studio è stato focalizzato sulla sintesi di ibridi organo-inorganici. Il metodo sol-gel ha ricevuto notevole attenzione negli ultimi anni grazie ai suoi vantaggi come la bassa temperatura di processo, alta omogeneità dei prodotti finali e la possibilità di convertire nelle migliori condizioni i metalli alcalinoterrici nel corrispondente ossido inorganico (es. titanio, silicio, allumina) con una matrice polimerica. Generalmente, il prodotto formato può essere considerato come un polimero inorganico avendo un network strutturale tridimensionale capace di intrappolare molecole di polimero organico. Le reazioni coinvolte nel processo sol-gel permettono l'incorporazione di unità polimeriche organiche in un network inorganico. Gli ibridi si prospettano come un'alternativa per ottenere materiali con caratteristiche innovative. La sintesi di tali materiali ha lo scopo di eliminare, gli svantaggi connessi all'utilizzo dei singoli componenti quali i polimeri e i ceramici. Nel caso dei polimeri, accanto ai vantaggi rappresentati dalla bassa densità, alta tenacità e quindi facili da lavorare, abbiamo anche svantaggi associati alla bassa resistenza meccanica e alla degradazione. I ceramici hanno il vantaggio di avere elevata resistenza, buona biocompatibilità e non si degradano (inerzia chimica), tra gli svantaggi ricordiamo la fragilità e le difficoltà di lavorazione. Nel presente lavoro sono stati realizzati, con la tecnica sol-gel, ibridi organo-inorganici per i quali sono state considerate due tipi di matrici inorganiche, il sistema $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3$ e il sistema a base di TiO_2 , la parte organica per entrambi i sistemi è rappresentata da un poliestere biodegradabile quale il poli-ε-caprolattone (PCL). Tali campioni sono stati caratterizzati sia da un punto di vista chimico che biologico per poterli identificare come biomateriali.

Si definisce biomateriale un materiale concepito per interfacciarsi con i sistemi biologici per valutare, dare supporto o sostituire un qualsiasi tessuto, organo o funzione del corpo (II International Consensus Conference on Biomaterials, Chester, G.B., 1991).

Le prestazioni dei materiali impiegati in campo medico sono valutate in base alla loro biocompatibilità e biofunzionalità. La biocompatibilità rimane il tema centrale per le applicazioni dei biomateriali in medicina. E' generalmente accettato che

questo termine significa non solo l'assenza di un effetto tossico ma anche gli effetti positivi nel senso di biofunzionalità. Quest'ultima si riferisce alle proprietà che un dispositivo deve avere per riprodurre una determinata funzione dal punto di vista fisico e meccanico. Oltre allo studio della biocompatibilità di questi materiali, in questo lavoro è stata studiata anche la bioattività, ossia la capacità dei materiali di promuovere la formazione di idrossiapatite sulla loro superficie quando sono posti a contatto con un fluido biologico (SBF), e quindi di valutare la loro capacità di osteointegrarsi in seguito ad un impianto. L'incorporazione di ampicillina in questi materiali ha permesso, inoltre, lo studio del rilascio controllato dell'antibiotico. Lo scopo di sviluppare sistemi a rilascio controllato è quello di ridurre la frequenza del dosaggio o/e aumentare l'efficacia del farmaco attraverso la circoscrizione del sito d'azione, di conseguenza riducendo la dose richiesta o provvedendo a un rilascio di farmaci costante. Se si immagina il sistema di rilascio ideale, esso dovrebbe avere due requisiti. In primo luogo esso deve contenere una singola dose per l'intera durata del trattamento sia esso per giorni o settimane, come nel caso delle infezioni, sia esso per l'intera vita del paziente, come per l'ipertensione o per il diabete. Il secondo requisito di un sistema a rilascio controllato è che il sistema deve rilasciare l'entità attiva direttamente sul sito d'azione, di conseguenza minimizzando o eliminando gli effetti collaterali. È ovvio che questo sistema di rilascio avrà requisiti differenti per differenti stati di disagio e per differenti farmaci.

Evidentemente, le strutture ibride determinano molte opportunità per i biomateriali. Madre Natura ha designato molte di queste architetture, ed evidentemente i chimici aspirano a migliorarle! Lo studio di questi materiali ibridi organo-inorganici richiede l'interazione di scienziati di molte discipline. La potenzialità di questi materiali innovativi è certamente la produzione di composti con struttura più ordinata e anisotropa.

CAPITOLO I

BIOMATERIALI

1.1 Classi di materiali

La scienza dei materiali è l'insieme delle conoscenze chimiche e fisiche, che mette in relazione le proprietà di un materiale con la sua costituzione, consentendo di prevedere quale sarà il comportamento del materiale stesso in qualsiasi condizione d'impiego. La tecnologia dei materiali si occupa di processi atti a produrre materiali con determinate proprietà, le cui lavorazioni gli conferiscono forma e dimensioni di progetto.

I materiali impiegati nei differenti campi sono assai numerosi ed hanno caratteristiche profondamente diverse tra loro; tuttavia, tenendo conto sia della costituzione che del comportamento, è possibile classificarli in tre grandi categorie: metallici, ceramici, polimerici.

Lo studio di tali materiali rappresenta, attualmente, un settore di rilevante interesse nel sistema culturale ed economico mondiale sotto l'aspetto scientifico e produttivo, e costituisce, inoltre, uno dei campi di maggiore competizione e di più alto investimento di risorse umane e finanziarie.

La messa a punto e la disponibilità di nuovi materiali vengono ad assumere un sempre crescente interesse, in quanto la loro utilizzazione in settori ad ampia valenza sociale, quali quelli della salute, dei trasporti, delle telecomunicazioni, dell'energia, consentirà notevoli miglioramenti nelle prestazioni non disgiunti da un generale e più favorevole impatto sull'ambiente e sulla qualità della vita. Un esempio d'utilizzo di materiali innovativi per il miglioramento della qualità della vita è quello dell'applicazione dei biomateriali.

1.2 Biomateriali

La scienza dei biomateriali, è una disciplina che studia le interazioni che avvengono fra il materiale ed il tessuto in modo da fornire indicazioni o regole perché il materiale sia accettato dall'organismo; questo offre la possibilità di progettare nuovi materiali o soltanto modificare quelli già esistenti in modo che possano essere accettati dall'organismo. Ne consegue che la scienza dei biomateriali non può avere altro che una natura multidisciplinare, poiché si avvale delle competenze e delle leggi che regolano la Scienza dei Materiali, la Chimica, la Biologia, l'Ingegneria e la

Medicina. Tutte queste discipline devono interagire per portare all'obiettivo finale che consiste nel miglioramento della salute e della qualità della vita dell'uomo.

Per giungere ad una definizione della parola "biomateriale" si tenne nel novembre del 1982 la Consensus Development Conference on the Clinical Application of Biomaterials (Bethesda, USA), durante la quale un gruppo di esperti elaborò la seguente definizione di biomateriale: "Ogni sostanza o combinazione di sostanze, diversa da un farmaco, di origine sintetica o naturale, che può essere impiegata per qualsiasi periodo di tempo, da sola o come parte di un sistema che tratta, fa crescere o sostituisce un qualsiasi tessuto o organo del corpo".

Tale definizione è sicuramente troppo generica, in quanto comprende tessuti e organi trapiantati, materiali utilizzati per la realizzazione di parti e apparecchiature biomediche che non sono impiegate in diretto contatto con i tessuti del corpo umano e materiali impiegati per la realizzazione di dispositivi completamente extracorporei. Nel marzo del 1986, sotto il patrocinio della Società Europea dei biomateriali si è tenuta a Chester una seconda Consensus Development Conference con lo scopo di migliorare la definizione di un biomateriale. Esso fu definito come "una sostanza non vivente, utilizzata nella fabbricazione di un dispositivo medico che ha in qualche punto un'interfaccia con un tessuto vivente".

Sono, pertanto, esclusi i materiali viventi quali organi trapiantati, ma inclusi i tessuti d'origine biologica trattati e non più viventi; inoltre, non si fa riferimento alla durata del contatto tra il materiale ed il tessuto vivente dell'organismo ospite, ma si richiede espressamente che tale contatto avvenga affinché il materiale sia un biomateriale [1].

L'uso nell'impiantologia chirurgica di materiali sintetici o naturali e di manufatti trova le sue origini in tempi antichissimi.

Gli Aztechi, ad esempio, adoperavano legni resinosi introdotti nel canale midollare delle ossa lunghe come infibulo, praticando, inconsapevolmente, la tecnica che nella medicina moderna è stata definita "osteosintesi".

Solo negli ultimi decenni si è avuta una grande rivoluzione nell'uso dei biomateriali. I biomateriali, oggi, si prestano a tutta una serie d'applicazioni dalla sostituzione del cristallino con lentine intraoculari fino a situazioni estreme di sostituzione totale d'organi fondamentali (cuore artificiale, protesi all'anca, ecc.). Il problema maggiore che s'incontra nella progettazione di un biomateriale è il dover far fronte alle diverse e severe condizioni a cui il materiale deve sottostare, in quanto deputato a sostituire

funzioni molto complesse e delicate in un ambito molto complicato ed aggressivo quale il corpo umano [2].

Per essere accettabile come biomateriale, una sostanza deve, infatti, rispondere a requisiti di natura meccanica, ma deve anche essere biocompatibile, ossia deve essere accettata dall'organismo, in maniera tale da determinare una favorevole reazione alla sua presenza in una specifica applicazione, cioè deve interagire con il ricevente in maniera non tossica, controllata e prevedibile [3]. In passato i ricercatori si sono concentrati su materiali biomedici che reagivano poco con i tessuti e scatenavano scarsissime reazioni. Una certa inerzia è ancora oggi un obiettivo importante per molti scopi, ma in realtà nell'organismo non vi è nulla di totalmente inerte. Inoltre, oggi si sa che non tutte le interazioni tra materiali estranei e organismo hanno effetti negativi; certamente i materiali che provocano infiammazione o una reazione di rigetto sono da evitare.

Alcuni materiali da impianto, per esempio, formano legami chimici con il tessuto circostante e rendono più stabile la protesi. Certi altri materiali sono gradatamente riassorbiti (cioè prima degradati e poi assorbiti) dall'organismo quando non sono più necessari per il compito per il quale erano stati inizialmente designati.

Le applicazioni dei biomateriali nella fabbricazione di protesi, organi artificiali e dispositivi medici, sono molto vaste. È opportuno mettere in luce come alcune di tali applicazioni prevedano la totale impiantabilità, debbano, cioè, essere utilizzate completamente all'interno dell'organismo (protesi oculari, protesi valvolari cardiache, protesi vascolari, placche ossee, ecc.), altre sono completamente esterne, anche se in contatto diretto con tessuti viventi (lenti a contatto, dializzatori, ecc.), altre sono parzialmente impiantate (protesi dentali, pelle artificiale, strutture, ecc.).

Un'interessante classificazione dei biomateriali riguarda le aree d'applicazione; un'altra, più tradizionale, classificazione dei biomateriali è quella riguardante le classi di materiali basate su aspetti chimico-strutturali. Secondo tale classificazione è possibile raggruppare i diversi materiali in cinque categorie: metallici, polimerici, ceramici, compositi e biologici.

Tali categorie si differenziano anche per le proprietà vantaggiose o svantaggiose in relazione all'applicazione biomedica, proprietà che derivano direttamente dalle loro caratteristiche chimico-strutturali.

È necessario sottolineare l'importanza della conoscenza della struttura dei materiali, in quanto è proprio la struttura che ne determina le proprietà, tra cui anche quelle

tecnologiche, infatti, affinché un materiale possa essere impiegato con successo in una determinata applicazione, deve avere sia le caratteristiche fisiche e chimiche appropriate, sia quelle tecnologiche che gli consentono la trasformazione in un manufatto. La mancanza delle caratteristiche tecnologiche rende, talvolta, inutilizzabili, per certe applicazioni, materiali che hanno, invece, adatte proprietà fisiche e chimiche [1]. Difatti, i materiali usati per il sistema cardiovascolare, devono essere elastici ed emocompatibili, mentre, per gli innesti ossei tali materiali devono essere rigidi e resistenti alle sollecitazioni. Inoltre, idealmente, tali innesti dovrebbero risiedere nell'osso senza interferire con la sua remineralizzazione, processo naturale mediante il quale l'organismo ricostituisce l'osso riassorbito. Le protesi metalliche sono state per molto tempo il punto di forza sia dell'ortopedia che dell'odontoiatria. I problemi connessi all'utilizzo di queste protesi, però, sono legati al fatto che esse sono diverse dai tessuti naturali sia sotto il profilo meccanico sia sotto quello della composizione.

Dato che i metalli sono più resistenti dell'osso naturale, essi tendono a sopportare direttamente qualunque carico cui è sottoposto l'osso.

La sollecitazione sull'osso normalmente lo stimola a crescere; pertanto, la protezione dalle sollecitazioni che la protesi esercita può condurre ad un riassorbimento dell'osso e, quindi, ad una minore stabilità della protesi nella sede d'impianto. Poche protesi metalliche sottoposte ad un carico durano più di vent'anni, e, per questo motivo, non sono ideali per i giovani. L'esigenza di ottenere, quindi, prestazioni molto specifiche ha rivoluzionato la filosofia d'approccio alla progettazione di un elemento protesico. Fino ad oggi la progettazione è stata condotta pensando prima all'oggetto da realizzare e successivamente scegliendo, tra quelli esistenti, il materiale più idoneo alla realizzazione. Oggi si tende a progettare il materiale in base alle specifiche richieste della particolare applicazione ed, in particolare, alla realizzazione di un materiale che simuli correttamente la risposta meccanica dei tessuti naturali attraverso una perfetta replica della struttura, microscopica e macroscopica, del materiale naturale. La tendenza attuale è quella di individuare il rapporto esistente tra l'organizzazione strutturale e il funzionamento dei biosistemi naturali. Attraverso l'interpretazione della funzionalità meccanica dei singoli elementi costituenti la microarchitettura strutturale dei tessuti naturali, il progettista acquisisce le direttive progettuali per la realizzazione dell'elemento protesico. Questa nuova linea d'approccio, ha portato nel campo ortopedico ed

odontoiatrico, all'utilizzo di protesi in materiale composito. Sempre in questi campi, alla luce del nuovo concetto d'interazione tra biomateriale ed ambiente biologico, sono stati messi a punto materiali ceramici, vetri e vetroceramici bioattivi, che formano legami chimici tra le loro superfici e l'osso adiacente; si ritiene che essi incoraggino la formazione di un nuovo osso. I Bioglass, sono stati i primi vetri bioattivi di cui si è riconosciuta la capacità di formare legami chimici con l'osso; essi contengono, al posto di una parte della silice dei vetri convenzionali, calcio, fosforo e sodio, tutti componenti dell'osso naturale; inoltre, sembrano non indurre da parte dell'organismo nessuna reazione infiammatoria o di rigetto, stabiliscono con l'osso legami resistenti grazie a meccanismi di cementazione dell'osso apparentemente normali ed infine, non interferiscono con la deposizione naturale di sostanze minerali dell'osso circostante.

1.3 Metodo di preparazione: tecnica sol-gel

L'interesse nei materiali realizzati con la tecnica sol-gel non è solo relativo alle loro proprietà fisiche e chimiche, ma alla possibilità di avere materiali a diverso stato colloidale. La viscosità del sol permette la facile preparazione di films tramite processi come dip-coating, spraying o spin-coating [4,5]. Un sol è una dispersione di particelle solide o polimeriche in un liquido.

È possibile precipitare le particelle del sol che sono amorfe o cristalline, o far sì che particelle amorfe cristallizzino attraverso un processo di dissoluzione e riprecipitazione. Quest'ultimo processo può produrre particelle che differiscono poco dagli ordinari ossidi ceramici, eccetto che le particelle così ottenute siano molto piccole (submicron). Se la solubilità della fase solida nel liquido è bassa, i monomeri possono unirsi irreversibilmente in aggregati (clusters) sempre più grandi, così da rendere impossibile il riarrangiamento in una struttura di equilibrio. In questo caso, i clusters polimerici hanno una struttura a frattali che è completamente diversa dai ceramici; essi hanno tipicamente una più bassa connettività (cioè, un minor numero di ossigeni a ponte) e conseguentemente contengono un maggior numero di gruppi idrossilici e di ligandi organici.

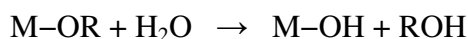
Un gel consiste in un reticolo solido continuo circondato e supportato da una fase liquida continua. Il reticolo può derivare dalla destabilizzazione, di un sol di particelle, causata dalla riduzione del doppio strato repulsivo, oppure può derivare dalla reticolazione (crosslinking) di clusters polimerici. In tutti i casi, l'energia libera del gel è molto simile a quella del sol, poiché pochi legami devono formarsi per produrre un aggregato molto esteso, perciò non c'è nessun effetto termico quando si ha la gelificazione.

È importante notare che un sistema può rimanere in un equilibrio metastabile con un'energia libera più alta rispetto ad un altro stato d'equilibrio, se esiste una barriera che si oppone al riarrangiamento, quale ad esempio un doppio strato elettrico. Un gel ha un'energia libera più alta di un vetro ottenuto da fuso d'uguale composizione nominale, poiché esso ha una più elevata area interfacciale ed una più bassa densità di crosslink, con gruppi idrossilici e ligandi organici terminali. Il gel è instabile, non metastabile, poiché non c'è alcuna barriera energetica che impedisca il rilassamento del gel stesso verso lo stato vetroso. La struttura del gel si conserva solo perché la mobilità degli atomi è limitata a bassa temperatura. La trasformazione della struttura verso uno stato amorfo più denso o uno cristallino avviene quando la mobilità è

permessa da una temperatura sufficientemente elevata e/o dalla presenza di un solvente.

La chimica coinvolta nel processo sol-gel è basata su una polimerizzazione inorganica [5-7]. Nella parte inorganica, i precursori sono usualmente componenti metallo-organici come gli alcossidi. Polimeri di ossido di metallo possono essere ottenuti attraverso idrolisi e condensazione di precursori molecolari come alcossidi di metalli $M(OR)_Z$: ($M = Si, Ti, Zr, Al...$; $OR = OC_nH_{2n+1}$ e Z è la valenza o lo stato di ossidazione del metallo) [6-8].

La reazione procede prima attraverso l'idrossilazione dell'alcossido di metallo, che accade dopo l'idrolisi del gruppo alcossido, come viene riportato di seguito:



Il meccanismo avviene in tre fasi:

- (a) attacco nucleofilico al metallo M dall'atomo di ossigeno della molecola di acqua;
- (b) trasferimento di un protone dall'acqua a un gruppo OR del metallo;
- (c) rilascio della risultante molecola ROH [6, 9].

Non appena i gruppi idrossi reattivi si sono generati, la formazione di scheletri di oligomeri e polimeri basati su un ossido di metallo e gruppi residui idrossi e alcossi reattivi si formano attraverso il processo di policondensazione. Le condizioni sperimentali dipendono da due meccanismi competitivi descritti nel modo seguente:

- (i) Ossalazione: formazione di ponti O



Come l'idrolisi, l'ossalazione è una delle tre fasi della reazione di sostituzione nucleofila che avviene attraverso l'eliminazione di H_2O o ROH . Generalmente, per un rapporto di idrolisi stechiometrico ($h = H_2O/M < 2$) è favorita la produzione di alcol, mentre la produzione di H_2O si ha con un alto rapporto di idrolisi ($h \gg 2$) [5,6].

- (ii) Olazione: formazione di ponti idrossi



Questa reazione non ha bisogno del trasferimento del protone e la rimozione di un gruppo uscente; conseguentemente, le cinetiche dell'olazione sono usualmente più veloci dell'ossalazione [7].

Queste tre reazioni (idrolisi, ossalazione ed olazione) possono essere coinvolte nella trasformazione di un precursore di alcossido di metallo ad un network macromolecolare di ossido di metallo. La struttura e la morfologia del risultante network dipende fortemente dal contributo di ognuna di queste reazioni. La

ricombinazione di questi polimeri di ossido di metallo possono produrre grandi strutture che invadono tutto il volume. Quando questi ossi-polimeri reagiscono microscopicamente il bagno di reazione diventa un gel nel quale il solvente, prodotto di reazione, e polimeri liberi sono intrappolati [5,10,11]. Un gel non è il solo possibile risultato di ogni reazione di polimerizzazione, possono essere raggiunti altri stati, includendo sols dove le strutture polimerizzate non reagiscono microscopicamente, con la formazione di precipitati [5,12]. Questa variabilità deriva da differenti modi nei quali gli oligomeri e polimeri possono essere legati e organizzati quando sono dispersi nel solvente. Tale controllo è compiuto attraverso cambiamenti nella reattività chimica di ogni sistema. Il rapporto di idrolisi ($h = H_2O/M$), l'uso di catalizzatori [5,13], l'uso di ligandi complessati o reagenti nucleofili [14-16], la natura dei solventi, e la temperatura sono i parametri chimici controllati dalla chimica del sol-gel [15].

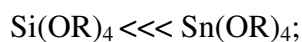
La reattività chimica dell'alcoossido metallico verso reazioni nucleofile dipende, inoltre, dalla forza del nucleofilo, dal carattere elettrofilo dell'atomo metallico [6-8], e dalla sua abilità ad aumentare il numero di coordinazione N. Il grado di insaturazione della coordinazione del metallo può essere semplicemente espressa dalla differenza N-Z, dove N è il numero di coordinazione usualmente trovato nell'ossido (N=6 per TiO_2 e SnO_2 , N=7 per ZrO_2 , N=8 per CeO_2) e Z è lo stato di ossidazione. La tabella I riporta l'elettronegatività (χ), raggio ionico (r) e il grado di insaturazione del metallo (N-Z) per differenti alcoossidi metallici tetravalenti. In generale, l'elettronegatività dell'atomo di metallo diminuisce, la loro sezione cresce, e la reattività chimica del corrispondente alcoossido dovrebbe aumentare lungo il periodo della tavola periodica.

Alcoossidi	χ	r (Å)	N	N-Z
$Si(OPr^i)_4$	1.74	0.40	4	0
$Sn(OPr^i)_4$	1.89	0.60	6	2
$Ti(OPr^i)_4$	1.32	0.64	6	2
$Zr(OPr^i)_4$	1.29	0.87	7	3
$Ce(OPr^i)_4$	1.17	1.02	8	4

Tabella I

Il Silicio ha una bassa elettrofilicità e rimane di coordinazione 4 nel monomero alcoossido precursore $Si(OR)_4$ così come in SiO_2 , ciò comporta che gli alcoossidi di silicio non sono molto reattivi. La gelazione avviene entro diversi giorni dopo che è

stata aggiunta H₂O. Per gli alcossidi di metalli non-silicati, includendo i metalli di transizione, lantanidi, alluminio e stagno, sono molto più reattivi del silicio. Essi sono molto sensibili all'umidità e dovrebbero essere maneggiati con cura in atmosfera controllata (dry-box) per evitare precipitazione in presenza di H₂O. Per alcossidi di metalli tetravalenti M(OR)₄, viene considerata la seguente sequenza di reattività [8,17,18]:



Titanio, Zirconio e Cesio hanno minore elettronegatività del Silicio, mentre lo Stagno ha un valore più alto. Così, la differenza nel potere elettrofilo dell'atomo metallico non è il parametro chiave che può essere calcolato per la più alta reattività di questi alcossidi di non-silicati tetravalenti. Come mostrato nella tabella I, il loro stato di ossidazione Z è più basso del loro usuale numero di coordinazione nel corrispondente ossido. Quindi, il grado di insaturazione (N-Z) è la forza guidante della loro alta reattività. Le reazioni di idrolisi e condensazione degli alcossidi di metalli non silicati dovrebbero essere controllati usando additivi chimici. Come già è stato detto, il Silicio ha una bassa elettrofilicità e rimane a coordinazione 4 (N = Z = 4) nel monomero precursore alcossido così come in SiO₂. Inoltre, alcossidi di silicio non sono molto sensibili alle reazioni di sostituzione nucleofila. Le velocità delle reazioni di idrolisi e condensazione dovrebbero aumentare usando catalizzatori acidi o basici. Sotto condizioni acide le reazioni di idrolisi e condensazione sono influenzate in modo differente, la catalisi acida ha effetti più pronunciati sulla velocità di idrolisi; sotto queste condizioni il gruppo alcossi è più rapidamente protonato, facendo l'alcol un miglior gruppo uscente e aumentando, la cinetica di idrolisi. La condensazione coinvolge i gruppi nucleofili Si-OH che attaccano gli atomi di silicio portando alla formazione di silanoli protonati. Comunque, condizioni acide giocano un doppio ruolo, favorendo la formazione di gruppi silanoli protonati e inibendo, inoltre, alcuni nucleofili. La condensazione potrebbe accadere preferenzialmente tra gruppi neutri Si-OH e i silanoli protonati Si-OH₂⁺ localizzati sui monomeri o su gruppi finali di polimeri, ecc. Sotto condizioni basiche gli anioni idrossidi (OH⁻) e i silanoli deprotonati (Si-O⁻) sono presenti nel mezzo. Essi sono migliori nucleofili rispetto all'acqua e ai gruppi silani, promuovendo così un più veloce attacco all'atomo di silicio. Di conseguenza, la catalisi basica favorisce entrambe le reazioni di idrolisi e condensazione che accadono simultaneamente. La condensazione coinvolge l'attacco di

un silanolo deprotonato (Si-O^-) su una specie silossana neutra (Si-OR). L'acidità dei silanoli aumenta quando gruppi basici OH o OR sono rimpiazzati con gruppi OSi per la ridotta densità elettronica sull'atomo Si. Conseguentemente, sotto condizioni basiche la condensazione avviene preferenzialmente tra più specie condensate, che contengono i silanoli acidi, in quanto la deprotonazione è più semplice. Queste differenze in selettività tra condensazioni catalizzate da acidi o basi promuove la formazione di specie polimeriche di differenti forme e tessitura. Il risultato di una catalisi basica è un'aggregazione che induce a un network compatto di SiO_2 , mentre un network più disordinato con deboli ramificazioni polimeriche è ottenuto sotto condizioni acide. Precursori molecolari, oltre che Si(OR)_4 , possono essere usati a produrre gel basati su ossidi di silicio. Organoalcossisilani $\text{R}'_{4-x}\text{Si(OR)}_x$ ($\text{R} = \text{alchile, fenile, o H}$) sono stati anche usati come precursori nel processo sol-gel. Essi contengono legami Si-R (Si-C, Si-H) che possono essere conservati dopo l'idrolisi e portare la formazione di componenti ibridi di II classe.

Il normale corso delle reazioni di idrolisi e condensazione dei metalli alcossidi tetraivalenti non-silicati (NTMA), M(OR)_4 ($\text{M} = \text{Ti, Sn, Zr, Ce}$), dissolti in un solvente induce la precipitazione del polimero fuori dal solvente. La reattività dei NTMA attraverso reagenti nucleofili è guidata dal grado di insaturazione (N-Z) dell'atomo metallico [7]. Atomi metallici tendono a regolare da soli la loro reattività con l'aumento del numero di molecole coordinate usando i loro orbitali vacanti ad accettare elettroni da ligandi nucleofili. L'espansione della coordinazione è una generale tendenza degli alcossidi M(OR)_4 , e usualmente accade dalla solvatazione o ponti alcossi; inoltre, possono essere trovati precursori NTMA molecolari monomerici e oligomerici. La complessità molecolare dell'alcossido metallico dipende poi da parametri fisici (concentrazione, temperatura) così come da fattori chimici (solventi, stato di ossidazione dell'atomo metallico) [8,19,20] (Fig.1.3.1). In generale, la complessità molecolare aumenta con la grandezza atomica dell'atomo metallico e decresce con l'aumento di volume dei gruppi OR per effetti sterici [8].

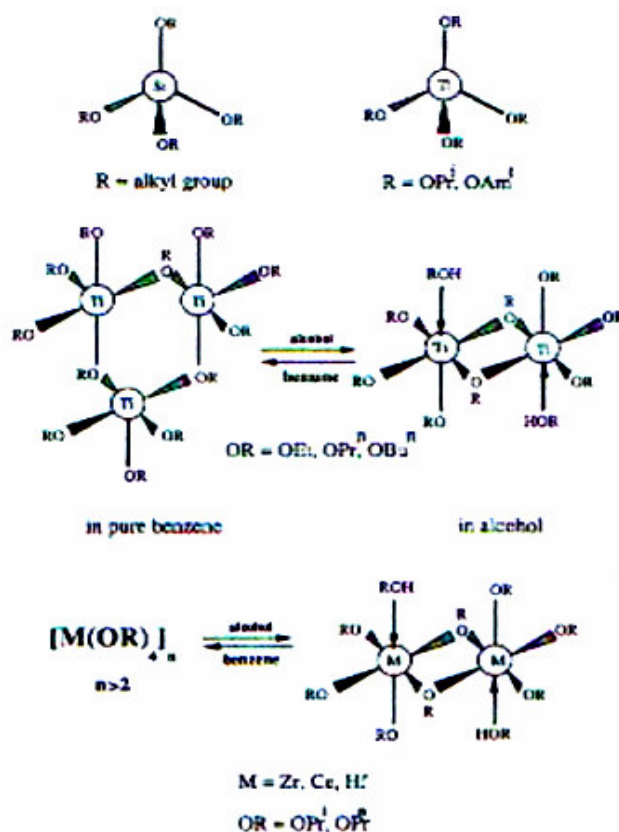


Fig.1.3.1 Struttura molecolare di metalli alcossidi tetravalenti

Specie oligomeriche $[\text{Ti}(\text{OEt})_4]_n$ ($n = 2, 3$) sono state evidenziate per l'etossido di titanio mentre l'isopropossido di titanio $\text{Ti}(\text{OPr}^i)_4$ rimane monomerico. L'ultimo componente, che contiene gli ingombranti gruppi OPr^i e Ti con un più basso numero di coordinazione, è molto più reattivo verso l'idrolisi. La solvatazione è spesso osservata quando gli alcossidi sono dissolti nel loro corrispondente alcol, in genere essa conduce a una decrescita della complessità molecolare e, quindi a diversi modi di soddisfare la coordinazione del metallo centrale. Conseguentemente, la complessità molecolare del metallo alcossido, può essere modulata da un'appropriata scelta del solvente che favorisce i ponti alcossi o la solvatazione. A temperatura ambiente, specie dimeriche solvate $[\text{Zr}(\text{OR})_4, \text{ROH}]_2$ sono state osservate in soluzione alcolica e poi isolate come singoli cristalli [19] mentre oligomeri $[\text{Zr}(\text{OR})_4]_n$ sono formati ($n \leq 4$) in solventi non polari come cicloesani. Questi ultimi solventi determinano una bassa velocità di idrolisi e la formazione di limpidi geli mentre per la forma, essi sono meno condensati e dove la coordinazione è soddisfatta dalla solvatazione, l'idrolisi procede in modo più veloce e determina la precipitazione.

Il controllo della reattività di NTMA può anche essere ottenuto attraverso l'aggiunta di acidi inorganici, β -dichetoni, acidi carbossilici, o altri ligandi complessati che inibiscono le reazioni di condensazione [16]. L'aggiunta di questi inibitori può prevenire la precipitazione, dà vigore alla crescita del gel, o fermare la crescita. Dopo l'idrolisi e condensazione di $\text{Ti}(\text{OBu}^n)_4$ dissolti in n-butanolo, è stato trovato che differenti rapporti di inibizione possono portare a sols, gel trasparenti, gel torbidi, o precipitati [12,21]. Dopo l'aggiunta di H_2O al precursore, una serie di reazioni chimiche accadono e che lasciano alla formazione di osso-polimeri. Le iniziali reazioni permettono al titanio di cambiare il suo stato di coordinazione attraverso addizione nucleofila e produzione di oligomeri con temporanei ponti "ol". Quando la maggior parte degli atomi di Ti ha aumentato la sua coordinazione in questo modo la reazione di olazione dovrebbe finire: infatti non ci sono disponibili posizioni a bassa energia per l'addizione nucleofila da tutte le molecole del solvente che sono state rimpiazzate da ponti OH. Dopo questa fase, accadono l'idrolisi addizionale e le lenti reazioni di condensazione (ossalazione). In accordo alla concentrazione dell'acido e alla coordinazione dell'ossigeno, specie nucleofile ($\text{Ti}-\text{OH}$) possono essere più o meno protonate causando inibizione selettiva di alcune reazioni di condensazione [12]. La reattività chimica di NTMA potrebbe essere controllata usando forti ligandi complessi come ad esempio l'acetilacetone (acacH) che reagisce con gli alcossidi dei metalli di transizione nel seguente modo [7,16,22,23]:



L'acetilacetone (acacH) è conosciuto ad essere un forte ligando chelante e spesso è stato riportato in letteratura come un agente stabilizzante per i precursori di alcossidi di metalli non silicati: $\text{Zr}(\text{OR})_4$ ($\text{OR} = \text{OPr}^i, \text{OPr}^n$) [24-27], $\text{Ti}(\text{OR})_4$ ($\text{OR} = \text{OPr}^i, \text{OBu}^n$) [22], $\text{Al}(\text{OBu}^s)_4$ [25], o $\text{Ce}(\text{OPr}^i)_4$ [18].

Le reazioni di idrolisi e condensazione degli alcossidi acac-modificati sono governati da due parametri: il rapporto di idrolisi ($h = \text{H}_2\text{O}/\text{M}$) e il rapporto di complessazione x definito come acac/M ($\text{M} = \text{Ti, Zr, Ce} \dots$) [18,23,25,26]. Ligandi complessati così come acacH determinano una diminuzione dei legami idrolizzabili M-acac che prevengono la condensazione e favoriscono la formazione di piccoli pezzi. Quando l'idrolisi degli alcossidi dei metalli di transizione acac-modificati $\text{M}(\text{OR})_{4-x}(\text{acac})_x$ ($\text{M} = \text{Ti, Zr, Ce}$; $x = 0-2$) è eseguita in presenza di un grande ammontare di H_2O ($2 < h < 20$), dipendendo

dal rapporto di complessazione e dalla concentrazione del metallo, sono ottenuti sols, gels, o precipitati. Entro il range di complessazione $x = 0-1$, l'idrolisi di precursori acac-modificati induce due differenti domini. Per $0.15 \leq x < 1$ sono ottenuti sols che possono tornare a gel in modo dipendente dalla concentrazione del metallo. La precipitazione è osservata per rapporto di complessazione più basso di 0.15. L'idrolisi dà legami reattivi M–OH che conducono alla condensazione piuttosto la formazione di più grandi specie. Una grande varietà di specie oligomeriche possono essere ottenute dopo idrolisi e condensazione. Clusters molecolari, catene polimeriche, o particelle colloidali possono essere sintetizzate dipendendo dal relativo ammontare di idrolisi (h) e complessazione (x). Molte più specie condensate sono ottenute con x decrescente e h crescente; ciò è rappresentato nel seguente grafico in Fig.1.3.2.

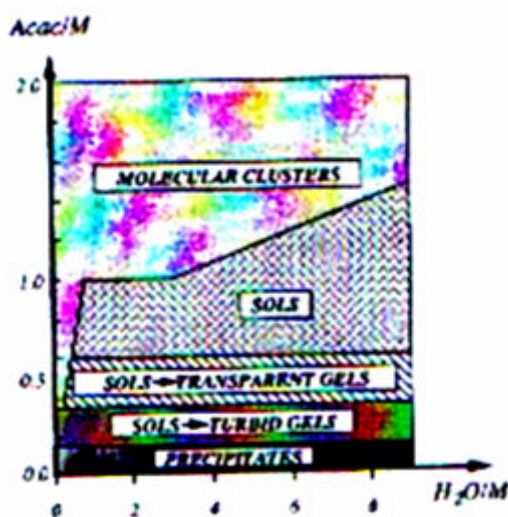


Fig.1.3.2 Descrizione del diagramma di stato sul comportamento idrolisi-condensazione di metalli alcossidi tetravalenti complessati.

Per quanto riguarda l'idrolisi dello zirconio n-propossido acac-modificato la Fig.1.3.3 rappresenta la struttura a raggi X di un cluster $[\text{Zr}_4\text{O}(\text{OPr}^n)_{10}(\text{acac})_4]$ ottenuto dopo idrolisi del precursore modificato $[\text{Zr}_2(\text{OPr}^n)_6(\text{acac})_2]$ [28]. Si può notare che molti gruppi propossi vengono rimossi dopo idrolisi mentre tutti i ligandi acetilacetoni rimangono legati, prevenendo successive reazioni di polimerizzazione.

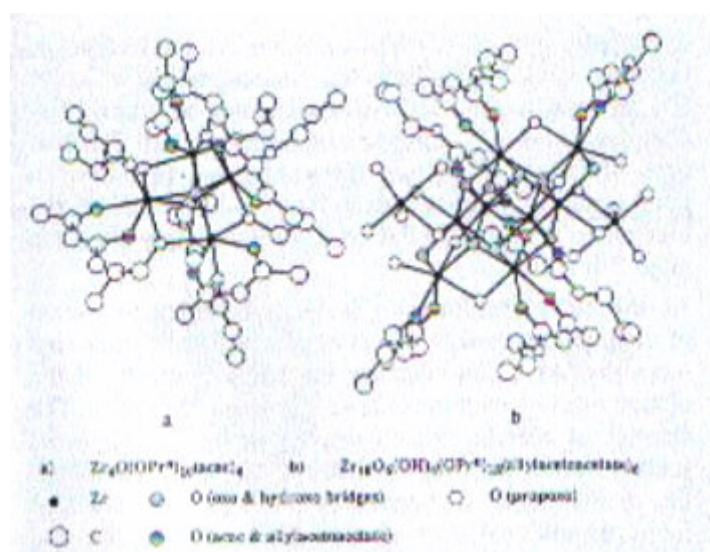


Fig.1.3.3 Struttura XRD del cluster $[Zr_4O(OPr^n)_{10}(acac)_4]$ dopo idrolisi del precursore modificato $[Zr_2(OPr^n)_6(acac)_2]$.

Dopo l'idrolisi di alcossidi di metalli acac-modificati il bagno di reazione contiene un insieme di alcossidi oligomerici, composti di precursori reattivi non-complessati e alcossidi di metalli modificati reattivi, la proporzione aumenta con l'aumento del rapporto di complessazione x .

Per bassi valori di x , idrolisi e condensazione sono molto veloci perché la coordinazione della maggior parte degli atomi di metallo non è efficientemente aumentata. La condensazione viene così guidata dall'olazione, come una conseguenza, ramificazioni del network polimerico possono estendersi, producendo un precipitato. Con un aumento di x , la proporzione del precursore modificato aumenta. La velocità di idrolisi dei gruppi alcossidi nei precursori complessati è più bassa dei gruppi alcossi nei negli alcossidi non modificati. Alcuni vantaggi del processo sol-gel rispetto al metodo tradizionale per fusione sono elencati nella tabella II.

Tabella II: Vantaggi del metodo sol-gel

- 1. Migliore omogeneità**
- 2. Maggiore purezza delle materie prime**
- 3. Bassa temperatura di preparazione con conseguente:**
 - a) risparmio di energia**
 - b) riduzione della perdita dovuta all'evaporazione**
 - c) minimo inquinamento**
 - d) affinità con principi attivi termolabili**
- 4. Nuovi solidi non - cristallini (al di fuori del campo di formazione dei vetri comuni)**
- 5. Nuove fasi cristalline**
- 6. Prodotti speciali come film.**

Inoltre, il processo sol-gel permette la sintesi di nuovi componenti ibridi organo-inorganici di dimensioni nanometriche ed esibiscono nuove proprietà. Le varie caratteristiche del processo sol-gel (precursori metallo-organici, solventi organici, basse temperature di processo) permettono l'introduzione di molecole organiche "fragili" in un network inorganico. Così molecole organiche possono migliorare le caratteristiche delle matrici, come ad esempio la modificazione delle proprietà meccaniche [29-31], films e fibre facilmente processabili, controllo della porosità, adattamento del bilancio idrofilico/idrofobico [32,33]. Inoltre, la componente organica può contribuire a proprietà particolari (proprietà ottiche [34-37] o elettriche [38], reazioni elettrochimiche [10], reattività chimica o biochimica [39-43]). Per quanto riguarda la componente inorganica del materiale contribuisce alla sua resistenza meccanica e termica [28-30], permette la modulazione dell'indice ottico [44,45], e può anche indurre da sola interessanti proprietà elettrochimiche [46], elettriche e magnetiche.

1.4 Biocompatibilità

La superficie di un materiale da impianto presentato alle cellule può essere considerata come una specie chimica estranea con siti reattivi. I gruppi terminali delle catene polimeriche possono anche reagire con gruppi reattivi come quelli delle molecole proteiche o dei carboidrati presenti nel siero. Quando un materiale è impiantato in vivo, esso è immediatamente coperto con uno strato sottile di fluido extracellulare attraverso il quale le cellule interagiscono con il materiale impiantato [47]. Il legame che si stabilisce potrebbe essere di tipo attrazioni di van der Waals o legami covalenti [48,49]. Le cellule a contatto con la superficie del biomateriale possono mostrare diverse risposte come l'induzione di una risposta infiammatoria attraverso la precipitazione del materiale. La natura della risposta cellulare determina se l'impianto inizia ad essere incapsulato con il tessuto fibroso, o inizia la crescita dell'osso (se in diretto contatto con l'osso) [49]. Ci sono quattro possibili risposte che possono accadere: la morte del tessuto (materiali tossici), formazione del tessuto fibroso (materiali inerti), formazione del legame interfacciale (materiali bioattivi), o sostituzione del tessuto circostante (materiali biodegradabili) [50,51]. La superficie del materiale può influenzare la reazione cellulare attraverso cambiamenti nel citoscheletro, un network di filamenti proteici si estendono attraverso il citoplasma cellulare dentro le cellule eucariotiche [52,53]. Il microfilamento di actina citoscheletrico è coinvolto nella formazione dei processi cellulari e dell'attacco cellulare. L'iniziale attacco delle cellule ai materiali è necessario per la successiva proliferazione ed espressione del fenotipo. Le cellule attaccano attraverso placche di adesione focale e questa interazione è portata attraverso le integrine, proteine transmembrana, localizzate ai siti di adesione. Questo processo risulta in un largo numero di differenti risposte cellulari, dipendendo dalle integrine espresse dalle cellule e dalla matrice extracellulare circostante (ECM) [52,54]. Proteine della ECM, integrine e componenti citoscheletrici sono coinvolti nell'adesione e nello spreading cellulare [55,56]. Comunicazioni tra cellula e matrice extracellulare accadono mediante la trasduzione di segnali attraverso l'actina citoscheletrica dalle proteine integrine al nucleo cellulare [57]. L'iniziale attacco della cellula al materiale è d'importanza fondamentale, perché il primo attacco può sostituire proteine depositate sulla superficie del materiale con fibronectina endogena, questo processo permette la successiva adesione [58]. Le integrine nella placca di adesione mediano l'attacco delle cellule alle proteine extracellulari adsorbite sulla superficie del materiale [59]. L'attacco delle cellule alla superficie del materiale riguarda anche la traduzione e la

regolazione genica [59,60]. Quando si considerano i materiali da impiantare si devono tener conto, quindi, di diversi fattori come la superficie del materiale, le condizioni dell'ospite e la biocompatibilità del materiale.

La biocompatibilità è considerata come il tema principale per le applicazioni dei biomateriali in medicina. E' stato generalmente accettato che questo termine indica non solo l'assenza di un effetto citotossico ma anche di effetti positivi in termini di biofunzionalità, es. la promozione di effetti biologici importante per l'applicazione di un biomateriale. La biocompatibilità coinvolge essenzialmente due aree, la prima è la biosicurezza, che coinvolge l'esclusione di effetti deleteri del biomateriale nell'organismo. La seconda area è la biofunzionalità, un aspetto che è in accordo con l'abilità a determinare un'appropriata risposta dell'ospite con una specifica applicazione [61]. La pressione nelle società industrializzate a ridurre gli esperimenti su animali, così come i progressi nelle metodologie in vitro, hanno aperto la strada ad una varietà di tests che sono adatti per gli standards ISO.

La biosicurezza comprende: test di citotossicità in vitro, MTT test, Sintesi del DNA, Test di integrità della membrana e Mutagenesi/Carcinogenesi.

1.4.1 Biosicurezza

1.4.1.1 Test di citotossicità in vitro

Questa componente della valutazione biologica dei dispositivi medici è centrale agli standard internazionali (ISO10993-5) che riguarda non solo uno specifico test, ma piuttosto considera linee guida per la scelta di tests e definisce i principi importanti degli stessi. Questi includono controlli negativi e positivi, condizioni di estrazione, scelta delle linee cellulari, del mezzo cellulare, così come aspetti importanti delle procedure dei tests, includendo test a contatto diretto e indiretto. Lo standard permette anche una valutazione qualitativa e quantitativa. Nello standard ISO categorie di valutazione sono presentate da:

- a) valutazione del danno cellulare,
- b) valutazione della crescita cellulare;
- c) valutazione degli aspetti specifici del metabolismo cellulare.

Un ulteriore metodo potrebbe riguardare la valutazione del cambiamento strutturale della cellula.

1.4.1.2 MTT test

Questo test quantitativo è una misura della funzione metabolica della cellula, dipendente sull'attività intatta dell'enzima mitocondriale, succinato deidrogenasi, che viene indebolita dopo esposizione della cellula ad un ambiente tossico. In breve, il test coinvolge la conversione di un sale di tetrazolio, 3-(4,5-dimetiltiazolo-2-yl)2,5-difenil tetrazolio bromide (MTT), a un prodotto insolubile, che può essere quantificato spettrofotometricamente [62].

1.4.1.3 Sintesi di DNA

Si considerano cellule in uno stato di non confluenza sottoposti a mitosi, antecedente alla sintesi del DNA (nella fase S del ciclo cellulare). Colture che sono entrate nella fase di crescita possono essere classificate con un nucleotide, componente elementare del DNA, che è stato marcato con un atomo radioattivo, come è il caso di timidina triaziata. In genere si preferisce l'uso di un precursore non radioattivo, bromodeossiridina (BrdU), che può essere dedotto da un anticorpo monoclonale fluorescente contro BrdU [63,64]. Usando colture parallele è possibile comparare colture di controllo con i test di colture che contengono il materiale o il suo estratto. Da questi mezzi è possibile determinare se il materiale causa la riduzione della proliferazione cellulare. I metodi per la quantificazione variano da conteggio diretto al microscopio, all'analisi flusso citometrica (FACS) al saggio immunoenzimatico (cell-EIA) [62].

1.4.1.4 Test di Integrità della Membrana

L'effetto tossico sulle cellule coinvolge alterazioni nelle funzioni della membrana, quali l'integrità funzionale e strutturale della membrana plasmatica che separa la cellula dall'ambiente circostante giocando un ruolo vitale. Un test per determinarne l'integrità è l'incubazione delle cellule con una combinazione della fluorosceina diacetata (FDA) e bromuro etidio (EB). FDA è convertita intracellularmente dalle cellule intatte da un'enzima esterasi a fluoresceina, che rimane nel citoplasma e dà una fluorescenza verde ad una corretta lunghezza d'onda. EB non può penetrare in una membrana plasmatica intatta, ma passa solo in quelle danneggiate, così che con un danno tossico EB entrerà nella cellula e si legherà covalentemente agli acidi nucleici, in particolare al DNA nel nucleo, ottenendo così una fluorescenza arancio o rossa.

1.4.1.5 Mutagenesi/carcinogenesi

Una metodologia in vitro correntemente in uso è il test di Ames, che coinvolge la scoperta di mutazioni delle funzioni metaboliche del batterio. Così un approccio

coinvolgerà tecniche specializzate a investigare acidi nucleici (DNA, RNA), sia a livello macromolecolare o, in caso del DNA, come elemento integrante di un cromosoma. E' così possibile lo studio del meccanismo di regolazione cellulare a due principali livelli: trascrizione genica e traslazione genica.

1.4.2 Biofunzionalità

Test di citotossicità in vitro usualmente coinvolgono linee cellulari permanenti, come le cellule Hela (derivate dal carcinoma cervicale umano) o le cellule L-929 (linea cellulare di fibroblasti di topo). Il concetto fondamentale dello studio della biofunzionalità in vitro è quello di stabilire saggi riproducibili e quantificabili che si concentrano sulle cellule coinvolte e parametri biologici rilevanti dall'applicazione dei dispositivi biologici. E' chiaro che questi parametri includeranno diverse funzioni come la proliferazione cellulare.

1.4.2.1 Adesione cellulare

L'adesione cellulare è probabilmente il più importante aspetto dell'interazione cellulare con il biomateriale e può o non può essere richiesto. Un dispositivo medico designato ad essere integrato nel tessuto osseo dell'ospite, es. protesi ossea, deve in prima analisi promuovere l'adesione cellulare, mentre cellule adese alla superficie di contatto con il sangue possono determinare serie complicazioni.

1.4.2.2 Spreading cellulare

Questo fenomeno, che coinvolge la riorganizzazione del complesso citoscheletrico, è una funzione essenziale di una cellula che inizia ad aderire alla superficie, e precede la funzione di proliferazione cellulare a dare una copertura cellulare della superficie.

Lo spreading cellulare è così un parametro di vitale importanza nello studio dei biomateriali designati ad essere integrati completamente nel tessuto ospite.

1.4.2.3 Proliferazione cellulare

La determinazione della proliferazione cellulare è la componente centrale dello studio dei materiali designati ad essere integrati nel tessuto ospite, come nel caso dell'osteointegrazione di una protesi dentale. Ad esempio cementi ossei nella pratica dentaria sono stati testati per valutare la loro abilità ad influenzare il ciclo cellulare degli osteoblasti.

Dopo un impianto di alcuni dispositivi medici in genere c'è sempre un'inflammatione dovuta all'interazione della cellula con il materiale. A facilitare questa interazione sono state studiate delle molecole di adesione cellulare (CAM), una serie di differenti

famiglie di molecole, che sono espresse sulla superficie delle cellule che controllano e rendono possibile l'interazione della cellula con altre cellule così come con i componenti della matrice, questi ultimi includono glicoproteine adsorbite sulla superficie del biomateriale impiantato. L'espressione delle CAM può essere considerato come un eccellente marker della biofunzionalità. Così, in impianti intesi per l'endotelizzazione, è importante non solo che il materiale può promuovere la crescita di un monostrato cellulare intatto, ma anche che le cellule siano funzionali. Un secondo campo rilevante la biofunzionalità successiva all'impianto del biomateriale è la produzione di citochine e dei fattori di crescita. Le citochine sono regolatori essenziali della reazione infiammatoria e quella immune e possono essere prodotte da diversi tipi cellulari. Esse possono sia attivare che inibire processi biologici e sono di centrale importanza nel controllo della risposta dell'ospite a un materiale impiantato.

1.5 Osteoblasti

Per gli studi di biocompatibilità dei materiali sintetizzati sono state utilizzate cellule osteoblastiche primarie umane (HOB).

La morfologia degli osteoblasti è caratterizzata da un largo nucleo, con un buon sviluppo dell'apparato del Golgi, e un'alta concentrazione di reticolo endoplasmatico rugoso con alcuni ribosomi liberi, la massa dei quali è normalmente presente nella parte opposta al nucleo, diffusioni di mitocondri e lisosomi sono anche presenti nel citoplasma [65].

La funzione degli osteoblasti è la formazione di nuovo tessuto osseo, e la loro attività in quest'area può essere divisa nel modo seguente: sintesi di collagene, sintesi di complessi di carboidrati e proteine, calcificazione e omeostasi minerale. Gli osteoblasti sono anche coinvolti nella produzione di proteine trovate nella matrice dell'osso. Proteine marker per gli osteoblasti includono la fosfatasi alcalina (ALP), osteopontina e osteocalcina. Una volta che gli osteoblasti sono posti in coltura, i geni di queste proteine sono in decrescita e le cellule iniziano a proliferare. La proliferazione decresce quando è raggiunta la confluenza, e il livello di ALP aumenta. Nel momento in cui si è raggiunta la confluenza nella matrice extracellulare accade la mineralizzazione, portando la formazione iniziale di tessuto osseo [66]. Nei primi 10-12 giorni di coltura, la proliferazione degli osteoblasti è il riflesso dell'alta attività mitotica dando espressione del ciclo cellulare e crescita cellulare (ad esempio eterodimeri di fattori di trascrizione che legano l'AP-1 della sequenza di DNA). Ad agire come proteine di regolazione nell'espressione di geni eucariotici ci sono i fattori di trascrizione che sono un gruppo di proteine e RNA polimerasi. La natura del legame dei fattori di trascrizione a specifici geni è critica nel determinare il pattern di trascrizione dei geni (esempio determina se uno specifico gene è espresso in tutte le cellule o solo in certe cellule/tessuti) in quanto questi geni codificano per proteine che favoriscono la proliferazione.

1.5.1 Osteoblasti in vitro

Colture primarie di cellule osteoblastiche danno vantaggi per lo studio del metabolismo delle cellule ossee e della differenziazione perché mantengono un genotipo normale, provvedendo ad un buon modello in vitro di valutazione delle interazioni materiale-osso [67-70]. In sospensione le cellule osteoblastiche hanno una morfologia rotonda, entro 2 ore di coltura, gli osteoblasti sferici estendono processi citoplasmatici, e le cellule hanno un aspetto appiattito. Una volta confluenti, gli osteoblasti appaiono

cuboidali o poligonali, non sono ad inibizione di contatto e sono in grado di crescere in multistrato. Questo effetto è evidente con la formazione di siti nodulari che sono necessari per la mineralizzazione in vitro. Gli osteoblasti producono una grande varietà di macromolecole fenotipo-specifiche, che permettono la caratterizzazione del tipo di cellula e possono essere usati per controllarne la de-differenziazione. Il più comunemente citato marker per gli osteoblasti è ALP, altri marker di osteoblasti sono relativi alla produzione della matrice. Il maggior componente della matrice ossea è il collagene I, che può essere dedotto immunoistochimicamente e quantificato biochimicamente. L'osso contiene anche circa 10% di proteine non-collagene, la più abbondante delle quali è l'osteocalcina (anche osteonectina, sialoproteine ossee, osteopontina e alcuni proteoglicani) [71]. Quando vengono usate cellule primarie, un problema potrebbe essere che le cellule possono de-differenziarsi con il tempo, e perdere il loro originale fenotipo con l'aumento del numero di passaggi. Schmidt and Kulbe [72] hanno mostrato un modello di cellule primarie osteoblastiche per 50 passaggi, e hanno trovato che le cellule producevano ancora alti livelli di ALP. Risultati simili sono stati osservati da Di Silvio e Gurav, dove osteoblasti primari umani sono stati coltivati per oltre 20 passaggi e comunque hanno conservato il loro fenotipo [73]. Bizios ha stabilito che l'uso di un modello di osteoblasti in vitro è essenziale per il progetto di biomateriali che promuovono e favoriscono una riparazione dell'osso all'interfaccia con il materiale [74]. Molti tipi di modelli di cellule osteoblastiche in vitro sono stati sviluppati, includendo cellule primarie umane, animali e trasformate. Molti modelli di cellule sono comunemente usati per lo studio del metabolismo osseo, includendo: UMR 106, ROS 17-2.8, SOS, U-2Os, MC3T3-E1, MG-63 e HOS TE-85. Queste linee cellulari hanno aiutato a capire la funzione dell'osteoblasto; linee cellulari immortalizzate, come cellule dell'osteosarcoma e cellule trasformate, non sono sempre rappresentative del fenotipo dell'osteoblasto, tale possibilità è dovuta alla fase di sviluppo della cellula quando avviene la trasformazione. Si dovrebbe notare che cellule immortalizzate tendono ad essere originate da tessuto fetale, che esibisce differente caratteristica di crescita dall'osso adulto [75]. Colture di cellule primarie osteoblastiche sono favorite per lo studio del metabolismo e la differenziazione delle cellule ossee [67,70-71]. Un "ideale" sistema primario dovrebbe permettere l'uso di una coltura cellulare in vitro a lungo termine senza dedifferenziazione [76]. L'uso di queste colture in vitro offrono il vantaggio di capire direttamente gli effetti del materiale sull'osso da riparare all'interfaccia con il materiale [74]. Una completa caratterizzazione di un

modello di cellule osteoblastiche umane primarie (HOBs) è stato sviluppato nell'Istituto Ortopedico di Londra [73,77], il modello si è basato dall'osservazione della crescita delle cellule da espianti di normali cellule ossee di adulto in coltura [78,79] e l'abilità degli osteoblasti a migrare dall'espianto femorale di varie specie, includendo quelle umane [80,81], nello sviluppo di un modello cellulare di osteoblasti umani (HOB). L'ottimizzazione delle condizioni di coltura sono risultate predominanti nella popolazione "pura" di cellule osteoblastiche. Cellule ossee isolate da frammenti di osso trabecolare sezionati dalla testa del femore (con cartilagine danneggiata, ma osso normale) sono stati ottenuti da pazienti sotto operazione chirurgica per la totale sostituzione della giuntura (Fig.1.5.1.1).

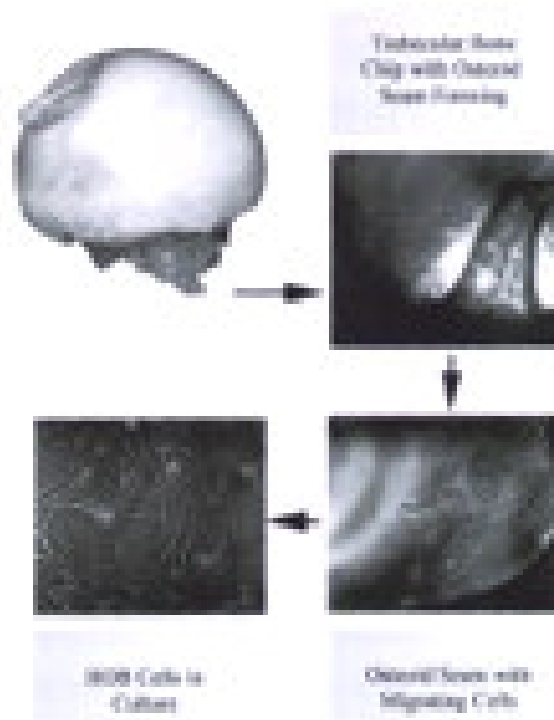


Fig. 1.5.1.1 Isolamento delle cellule HOB da frammenti di osso trabecolare

I frammenti dell'osso sono stati lavati e messi in coltura in un mezzo completo DMEM con 10% di siero fetale (FCS). Questa procedura induce allo sviluppo di osteoidi intorno al frammento osseo. Le cellule ossee rilasciate dal frammento sono state trattate con tripsina/collagenasi, in modo che per essere rilasciate nella fase liquida, dovranno essere centrifugate ottenendo un pellet e messo in coltura [73,77]. Di Silvio e Gurav [73] hanno mostrato che il modello delle cellule HOBs può mantenere il fenotipo

osteoblastico per più di 20 passaggi senza il bisogno di trasformazione, così provvedendo a un buon modello di studio della risposta biologica dell'osso. Questo modello cellulare ha dimostrato la stabilità nel fenotipo quando le colture sono sottoposte a diversi passaggi, mantenendo caratteristiche morfologiche e l'abilità di iniziare la deposizione di minerali in vitro.

Quindi, il sistema ideale di isolamento delle HOBs dovrebbe permettere colture di cellule senza de-differenziazione. Sotto condizioni selettive, è possibile la crescita di cellule differenziate che esibiscono una risposta metabolica tessuto-specifica e la sintesi di componenti strutturali della matrice[76]. I geni *Osf2/Cbfa* hanno un ruolo importante nella regolazione della differenziazione degli osteoblasti [82-84], infatti con l'assenza del gene *Cbfa1* l'ossificazione viene bloccata. Questo fattore di trascrizione ha un ruolo importante nella differenziazione degli osteoblasti ed è stato dimostrato che induce l'espressione di osteocalcina e osteopontina [85]. Comunque, le cellule hanno una caratteristica crescita abnorme e il grado di maturazione delle cellule fetali non è comparabile con quello delle cellule ossee umane adulte. Linee cellulari clonali possono esprimere recettori che non sono normalmente espressi, questo è di particolare importanza per lo studio degli effetti dei fattori di crescita, da cellule trasformate possono rispondere diversamente a cellule normali e possono produrre differenti regolatori di crescita. In aggiunta l'eterogeneità tra i cloni, variazioni fenotipiche possono esistere tra cellule figlie derivate da un singolo clone [76]. Queste differenze possono accadere come risultato delle cellule esposte a diverse condizioni di crescita a differenti fasi del ciclo cellulare. Un'alta o una bassa densità della presenza o dell'assenza di agenti mineralizzanti come β -glicerofosfato possono causare differenze. Ad un'alta densità, per esempio, l'espressione degli osteoblasti è in crescita, mentre a bassa densità questi marcatori cellulari sono ridotti [86,87]. In generale, cellule HOBs immortalizzate esibiscono proprietà osteoblastiche e determinate caratteristiche, includendo un'alta ALP, risposta a PTH e $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, produzione di osteocalcina e collagene di tipo I e, in alcuni casi, mineralizzazione in vitro [88-90]. Per quanto riguarda gli effetti di $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sull'attività della fosfatasi alcalina, si è visto che in colture di crescita cellulare le proteine cellulari nei "pre-osteoblasti" e "osteoblasti maturi" variano in modo dipendente dalla fase di maturazione degli osteoblasti [91]; la progressiva de-differenziazione è un problema maggiore con linee clonali [92]. La produzione e l'accumulo di prodotti osteoblastici nella matrice extracellulare e cambiamenti nella forma cellulare determinano segnali per la differenziazione.

L'acquisizione della morfologia di cellule osteogeniche normali può essere un prerequisito per lo sviluppo e la maturazione. Lo sviluppo dell'osso può essere diviso in tre fasi: proliferazione, maturazione extracellulare e mineralizzazione [93]. Ognuna di queste fasi è caratterizzata da picchi di livelli di espressione di geni di specifiche proteine; per il passaggio da una fase all'altra sono necessari specifici segnali. La mineralizzazione può a sua volta essere suddivisa in due fasi. Nella prima fase, gli osteoblasti secernono una matrice organica che viene considerata ad essere la matrice pre-ossea, generalmente chiamata osteoide. Gli osteoidi consistono di collagene di tipo I e di altre proteine includendo proteoglicani, glicoproteine e proteine non-collagene. Durante la seconda fase avviene la mineralizzazione, trasformazione dell'osteoide in osso. Nelle colture HOB accadono tre distinte fasi: crescita (proliferazione), sviluppo della matrice e mineralizzazione, fasi che avvengono in vivo. Il processo di mineralizzazione nell'osso lamellare e il controllo dei fattori di crescita non sono stati molto studiati, una ragione potrebbe essere la difficoltà nell'ottenere e mantenere abbastanza cellule primarie. Un'altra ragione è l'uso frequente di osso fetale, che ha caratteristiche di crescita differenti da quelle dell'osso adulto [67,87,94]. Cellule osteoblastiche possono essere fatte crescere come colonie di cellule compatte con una varietà di mezzi, includendo sospensioni di cellule in agarosio, metilcellulosa e collagene I. E' stato studiato che il pre-requisito della mineralizzazione degli osteoblasti è la formazione di multistrati; questo potrebbe essere ottenuto seminando le cellule in micromassa [95], dove un largo numero di cellule sono concentrate in un piccolo volume di mezzo e seminate in un pozzetto. L'alta concentrazione di cellule in un'area così piccola causa l'adesione delle cellule l'una all'altra, in alcuni casi sopra le altre formando strati. In colture primarie, osteoblasti isolati hanno mostrato di sintetizzare diverse proteine ed enzimi che sono conosciuti ad essere localizzati nell'osso, includendo la fosfatasi alcalina ALP, osteocalcina e collagene I. Cellule umane ossee primarie in colture convenzionali raggiungono la confluenza in 3-6 settimane. Se mantenute in coltura per un sufficiente lasso di tempo, le cellule formano dei "noduli", e in queste aree le cellule depositano una matrice densa e sviluppano un aspetto granulare. Questi noduli appaiono consistere di cristalli di calcio fosfato immersi in matrice. Il processo è usualmente associato con il rilascio dalla superficie della cellula di strutture simili a vescicole e ciò può iniziare la deposizione dei minerali. In alcuni sistemi di coltura lo sviluppo di cristalli può essere accelerato dall'aggiunta di 5-10 mM di β -glicerofosfato. Generalmente, la formazione dei noduli nelle colture

cellulari accade spontaneamente dopo circa 30 giorni con una matrice granulare densa. Le condizioni di coltura contribuiscono in modo significativo verso l'abilità delle cellule a differenziare e calcificare. L'aggiunta di agenti come il calcio β -glicerofosfato, calcio monofosfato esoso sono stati usati a promuovere la mineralizzazione di osteoblasti in coltura [95-98]. Per la caratterizzazione delle cellule HOB vengono eseguiti diversi test che includono la crescita cellulare, MTT test, Alamar Blue, la fosfatasi alcalina (ALP), osteocalcina, procollagene tipo I, e la risposta al PTH misurando la produzione dell'adenosina monofosfato ciclica (cAMP).

La fosfatasi alcalina è usata come marker del fenotipo degli osteoblasti, la sua attività in colture di cellule ossee è dipendente dalla fase del ciclo cellulare, dalla densità cellulare e dal tempo di coltura [99]. Il periodo di fase che accompagna la differenziazione in vitro differisce in misura dipendente dal metodo utilizzato, risultando in un ritardo tra le diverse fasi di espressione di singoli markers [100]. La fosfatasi alcalina può essere misurata andando a determinare il rilascio di p-nitrofenolo dal p-nitrofenolofosfato a 37°C in una soluzione tampone. La produzione di ALP dalle HOB è dedotta approssimativamente dal 4° giorno in avanti aumentando dal 10° giorno in poi. Una rapida diminuzione della proliferazione cellulare è coincidente con una rapida crescita della produzione di ALP. Un altro test si basa nella determinazione del collagene, il componente più abbondante nella matrice. Il collagene di tipo I deriva dalla proteina procollagene I, ed è un indicatore della sintesi della matrice. Il gruppo carbossiterminale del propeptide di tipo I procollagene (PICP) è utilizzato come indicatore biochimico della produzione del collagene I. Il PICP viene generalmente determinato con un saggio radioimmune. Un sensibile marker della differenziazione e mineralizzazione degli osteoblasti è la determinazione dell'osteocalcina, proteina sintetizzata solo dagli osteoblasti, la cui produzione dipende dal grado di mineralizzazione. Comunque, bassi livelli possono essere dedotti già dopo i primi 4 giorni dalla preparazione del monostrato di cellule HOB. Immediatamente seguita da una decrescita della proliferazione, come dedotta da un declino della sintesi del DNA, la crescita della fosfatasi alcalina (ALP) e crescita dell'espressione di osteocalcina [101]. Le cellule HOB rispondono all'ormone paratiroide (PTH) con un aumento della produzione intracellulare di cAMP. L'intensità della risposta al PTH può essere variabile, dipendendo dal tempo di coltura. La produzione di cAMP è misurata nelle HOB trattate con PTH per 24hrs su colture di 7, 14 e 21 giorni. Sotto condizioni di base, la produzione di cAMP è dedotta prima del 3° giorno da colture di cellule HOB,

ma usualmente cresce dopo il 7° giorno. Normalmente, nell'osso la produzione di fattori di crescita gioca un ruolo chiave nella formazione e rimodellamento dell'osso; uno dei più importanti fattori di crescita nel tessuto osseo è l'ormone della crescita (GH). Recenti studi hanno mostrato che l'ormone della crescita può anche agire sia sulla proliferazione [102] e differenziazione di osteoblasti umani [103,104]. Questo ormone ha un'attività mitogena su cellule osteoblastiche [105-107], mediata dall'azione paracrina ed endocrina del fattore di crescita IGF-1 [104,108]. IGF-1 è stato in grado di mantenere la differenziazione di colture di cellule osteoblastiche e aumentare l'attività della fosfatasi [109]. Vari studi sono stati fatti sulla stimolazione dose-dipendente delle cellule HOB in seguito all'esposizione dei fattori GH e IGF-1. Una dose ottimale dei fattori di crescita è nell'intervallo 50-150 ng/mL, una dose più bassa non ha alcun effetto, mentre una dose eccessiva determina una decrescita dei recettori.

CAPITOLO II

MATERIALI IBRIDI

2.1 Ibridi organo-inorganici

La possibilità di combinare le proprietà di composti organici e inorganici, in un unico materiale è una vecchia sfida, iniziata con l'era industriale.

Il concetto di materiali “ibridi organo-inorganici” è emerso solo recentemente, quando la ricerca si è spostata verso materiali più sofisticati. Gli ibridi organo-inorganici, sono materiali bifasici, le cui proprietà non sono, la somma dei singoli costituenti, ma si registra un largo effetto sinergico [110,111]. Generalmente le proprietà (stabilità, comportamento termico) di ogni singola fase, sono mantenute costanti nell'ibrido. Inoltre, vengono definiti ibridi organo-inorganici i materiali in cui la distanza tra i domini è inferiore a 400 nm [112].

La più semplice rappresentazione di un ibrido è data dall'incorporazione di piccole molecole organiche in un network inorganico, dando origine ad una soluzione non omogenea avente alta viscosità. Un modo che permette di superare la non omogeneità dei materiali ottenuti, è quello di miscelare dapprima il polimero e il metallo alcossido in un adatto solvente (alcool, THF) e poi in un secondo stadio aggiungere H_2O ed un appropriato catalizzatore. La migliore omogeneità si raggiunge quando le interazioni sviluppatesi tra le fasi, sono sufficienti per permettere ad entrambi i networks di essere connessi reciprocamente a livello molecolare. La scelta della componente organica (polimero) è fatta in base alle diverse proprietà quali:

- comportamento meccanico;
- comportamento termico;
- stabilità chimica;
- biocompatibilità.

Nel caso della componente inorganica (alcossido) si fa riferimento ad altre caratteristiche come:

- densità;
- indice di rifrazione;
- proprietà redox.

È possibile ottenere ibridi caratterizzati da deboli legami (legame idrogeno, forze di Van der Waals) tra le due fasi e perciò definiti di prima classe ed ibridi di seconda classe aventi legami forti (legame covalente oppure ionico-covalente) tra le due fasi. La natura dei legami presenti nella fase organo-inorganica cambia in seguito alla formazione dell'ibrido, così come cambia la sezione delle due fasi passando da pezzi grandi a pezzi più piccoli. Quest'effetto modula le proprietà dei materiali:

- comportamento termico;
- proprietà meccaniche;
- stabilità e dispersione della soluzione (la viscosità della soluzione è fortemente dipendente dalla massa molecolare M_w).

I materiali organici, generalmente, sono termicamente instabili, quindi per la sintesi degli ibridi organo-inorganici, sono necessarie basse temperature; il metodo che ci permette di soddisfare questa necessità è il metodo sol-gel. I materiali ibridi, suscitano grande interesse in vari campi d'applicazione, come quello meccanico, elettronico e biologico. La potenzialità di questi materiali innovativi è certamente la produzione di composti con struttura più ordinata e anisotropa. Gli ibridi organo-inorganici, o nanocompositi possono essere distinti in:

- ibridi di prima classe;
- ibridi di seconda classe.

2.1.1 Ibridi organo-inorganici di prima classe

I materiali ibridi sono prodotti ottenuti mescolando componenti organici ed inorganici in un comune solvente o impregnando esso in un network poroso comunemente trovato nei xerogel. Entrambe le strategie sono state ampiamente sviluppate dalla chimica del metodo sol-gel. Entrambi i tipi di materiali sono di natura amorfa e definiti di I classe. Essi esibiscono un'ampia varietà di proprietà interessanti (meccaniche, ottiche, elettriche, ioniche, sensori, bio-sensori...) che possono essere migliorati attraverso il controllo della loro microstruttura [113]. Il controllo delle proprietà del materiale finale è effettuato valutando la natura chimica delle fasi organica ed inorganica, la granulometria, la morfologia e la natura dell'interazione all'interfaccia [111]. La microstruttura e la ripartizione spaziale della componente organica ed inorganica sono governati da deboli interazioni come interazioni di Van der Waals, legami ad idrogeno. Esempi di ibridi di I classe sintetizzati con la tecnica sol-gel sono stati SiO_2/PCL e $\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2/\text{PCL}$ [114,115] in

cui l'esistenza del legame ad idrogeno tra la componente organica e quella inorganica è stata rilevata con l'analisi FTIR.

- ***Coloranti organici incorporati in matrici sol-gel***

Piccole molecole organiche intrappolate in un network inorganico rappresentano il più semplice esempio di materiale ibrido. Esso corrisponde al doping di matrici sol-gel mediante coloranti organici, ioni o molecole inorganiche. Molecole organiche, come rodamine, pirammine, porfirine, ecc, sono state intrappolate in network inorganici come silice, alluminosilicati o geli a base di metalli di transizione (ZrO_2 , TiO_2). Per la formazione dell'ibrido, i precursori inorganici (alcossidi), i coloranti e il catalizzatore sono mescolati in un solvente comune; l'acqua è poi aggiunta alla miscela per le reazioni d'idrolisi e policondensazione [116] e i coloranti sono uniformemente intrappolati nel polimero in crescita. Un'alternativa potrebbe essere quella di versare uno xerogel inorganico nella soluzione del colorante. La capillarità porterebbe ad una distribuzione omogenea delle molecole di colorante (Fig.2.1.1.1). Interazioni deboli tra il colorante e la matrice inorganica (legami a idrogeno, forze di Van der Waals, ecc) si spiegano con la dispersione del colorante nella struttura.

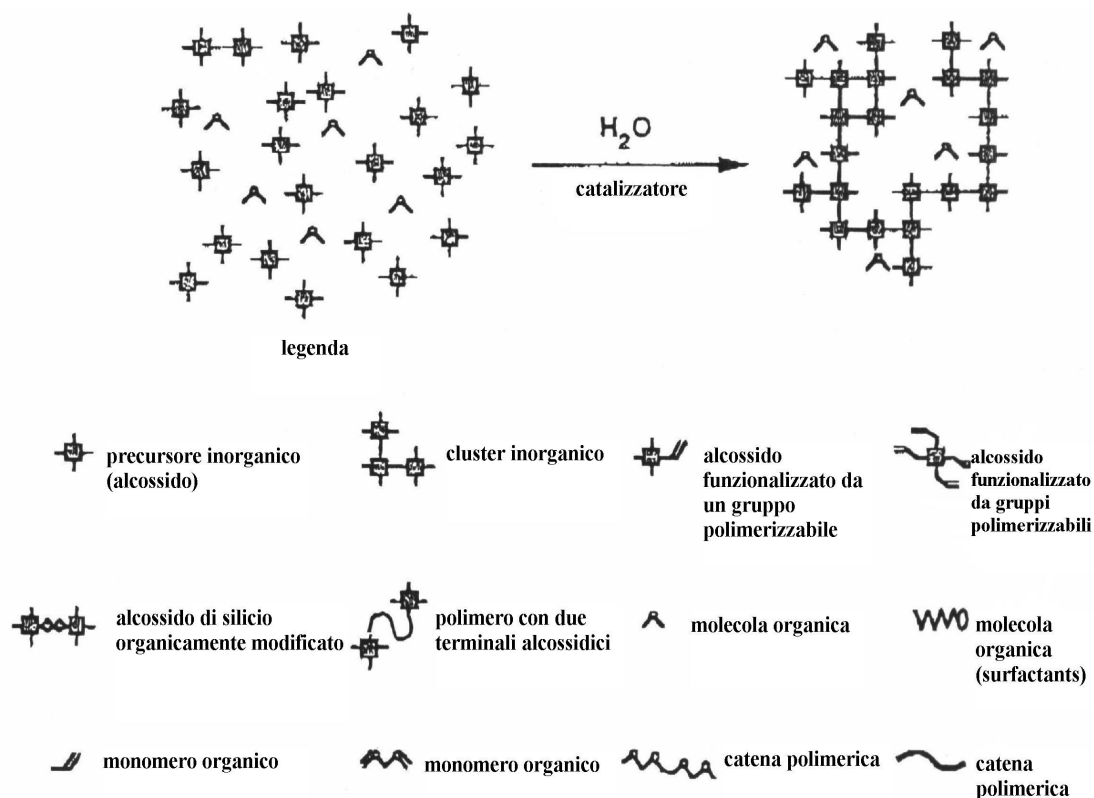


Fig. 2.1.1.1 Coloranti organici intrappolati in matrici sol-gel

• *Monomeri organici incorporati in matrici sol-gel*

È possibile ottenere ibridi, incorporando monomeri organici in matrici sol-gel. Le matrici inorganiche sono spesso strutture molto porose e in tali pori si possono riempire con varie molecole, immergendo la struttura in una soluzione contenente un monomero organico polimerizzabile (metilmetacrilato, butadiene e derivati) ed un catalizzatore. In un secondo stadio la polimerizzazione è fatta avvenire mediante irraggiamento UV oppure per riscaldamento (Fig. 2.1.1.2).

Monoliti trasparenti di grosse dimensioni con un buon indice di rifrazione possono essere ottenuti per applicazioni ottiche secondo diversi fattori, come la grandezza e la geometria delle cavità, la differenza dell'indice di rifrazione tra le due fasi e il rapporto materiale organico/inorganico [111].

Un problema ovvio è la differenza di densità tra monomero e polimero, che comporta un forte stress meccanico nel materiale e la formazione di molti difetti ottici. Molecole organiche funzionali possono essere mescolate con il monomero organico. Coloranti, come anche alcuni enzimi o porfirine, possono essere

incorporati in questi materiali ibridi dando origine a sensori o microsfere silicee fluorescenti.

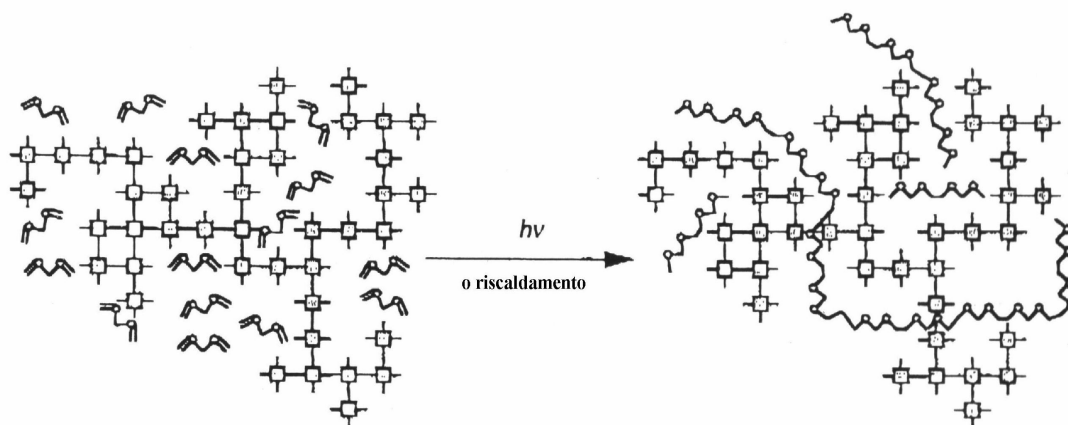


Fig. 2.1.1.2 Monomeri organici intrappolati in matrici sol-gel e loro polimerizzazione

• ***Particelle inorganiche incorporate in un polimero***

Per lungo tempo le proprietà meccaniche delle miscele polimeriche sono state migliorate incorporando riempitivi inorganici. Il processo convenzionale consiste nel mescolare il polimero (o un prepolimero) e le particelle inorganiche come mostrato in Fig.2.1.1.3. Tuttavia, l'alta viscosità delle particelle comporta l'agglomerazione delle stesse. La disomogeneità risultante del materiale fa diminuire le interazioni tra riempitivo e polimero. Usando un solvente opportuno si potrebbe prevenire tale disomogeneità.

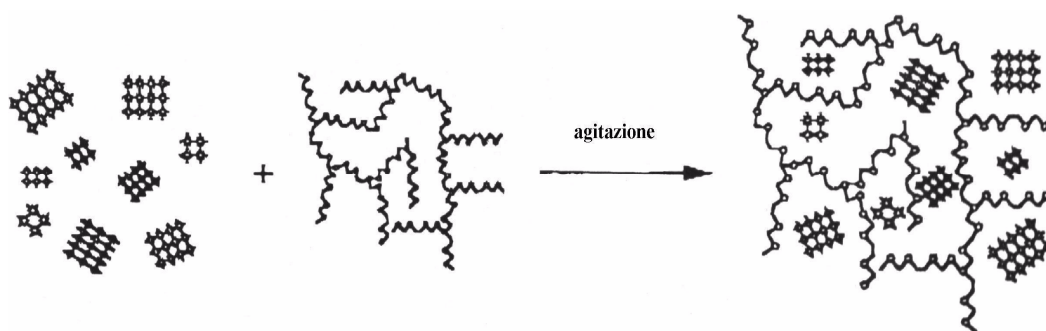


Fig. 2.1.1.3 Particelle inorganiche dissolte in geli o polimeri

• **Polimeri riempiti con particelle inorganiche fatte polimerizzare *in situ***

La possibilità di superare il problema della disomogeneità dei materiali ottenuti mediante l'incorporazione di particelle inorganiche in polimeri è rappresentata dalla costruzione di clusters inorganici all'interno della struttura polimerica (Fig.2.1.1.4). Un tipico metodo consiste nel mescolare insieme il polimero e l'alcoossido metallico in un solvente opportuno (alcol o THF). In un secondo stadio un catalizzatore e l'acqua sono aggiunti alla miscela e la policondensazione ha luogo *in situ*. Maggiore omogeneità si ottiene quando le interazioni deboli sviluppate tra le due fasi sono sufficienti a provocare per entrambe le reti, una mutua interpenetrazione a livello molecolare. Il processo sol-gel, genera, quindi, gruppi idrossilici, $M-O-H$, alcuni dei quali potrebbero rimanere sulla superficie del polimero inorganico in crescita, esibendo acidità. I gruppi carbonilici, presenti in molti polimeri organici come le poliammidi o i poliesteri, sono ben noti come forti accettori d'idrogeni per formare legami a idrogeno; la presenza di tali legami può essere evidenziata mediante spettroscopia NMR al ^{13}C o FTIR (Figs.2.1.1.5-2.1.1.7).

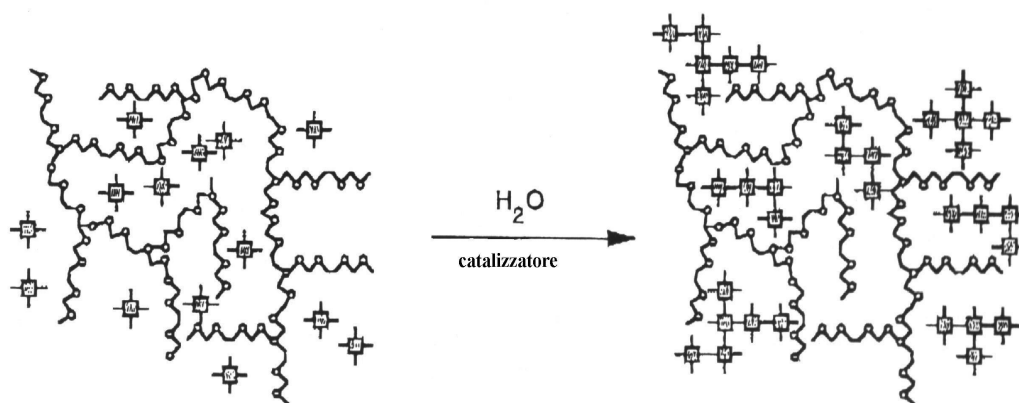


Fig. 2.1.1.4 Polimeri riempiti con molecole inorganiche polimerizzate *in situ*

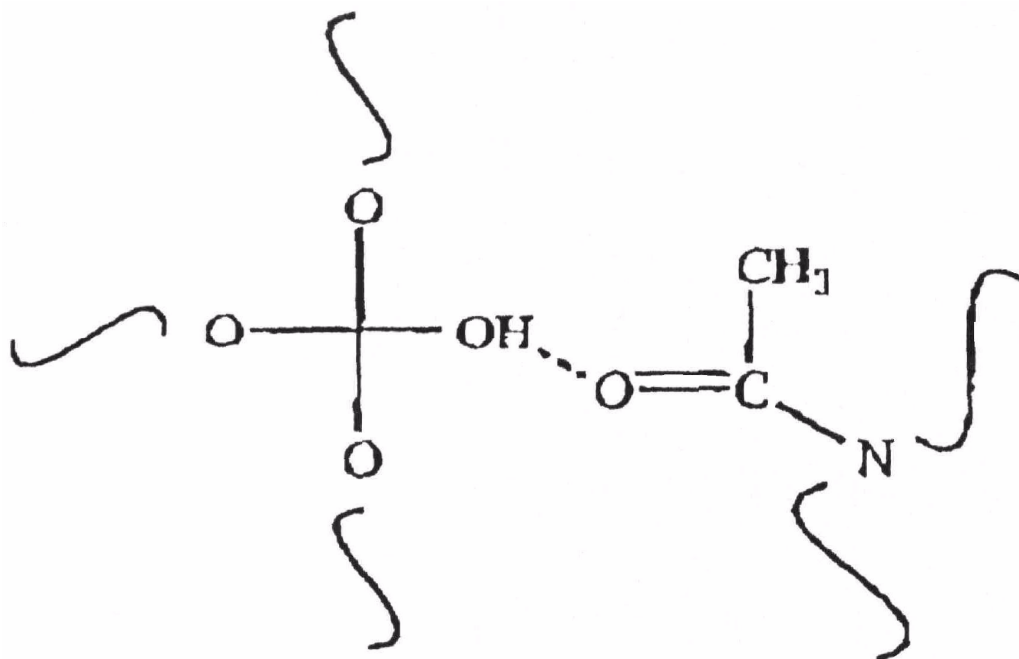


Fig. 2.1.1.5 Formazione del legame a idrogeno tra le due fasi

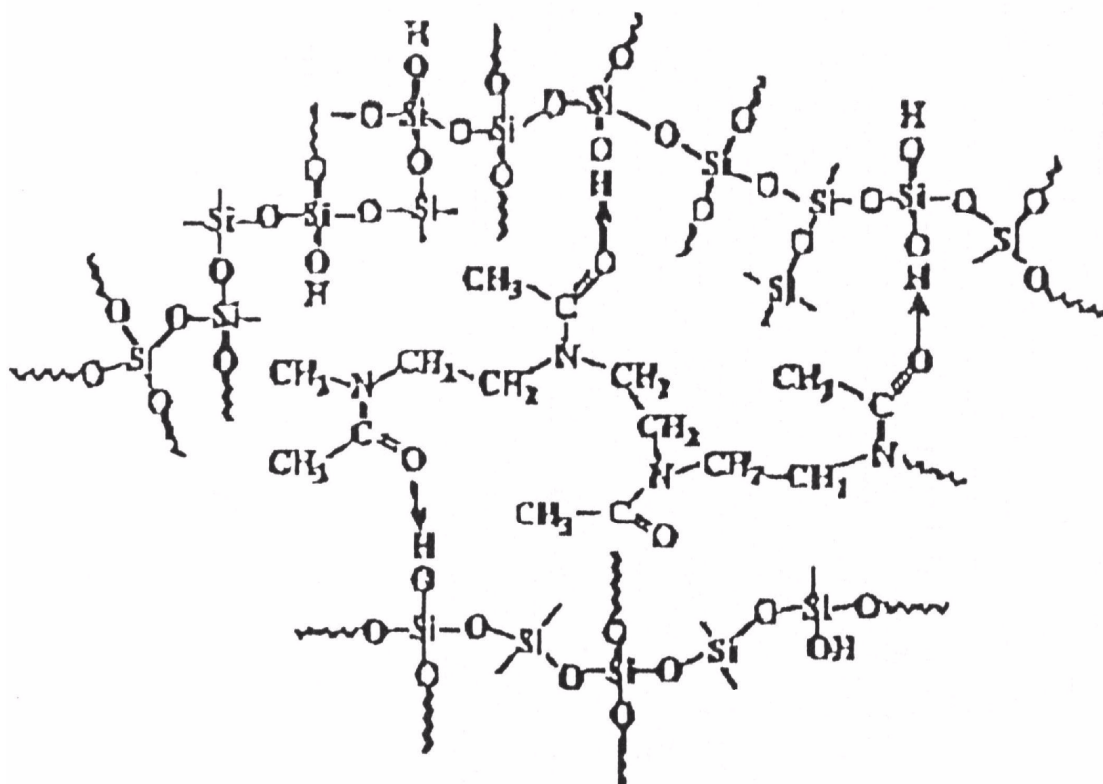


Fig. 2.1.1.6 Struttura di un generico materiale ibrido

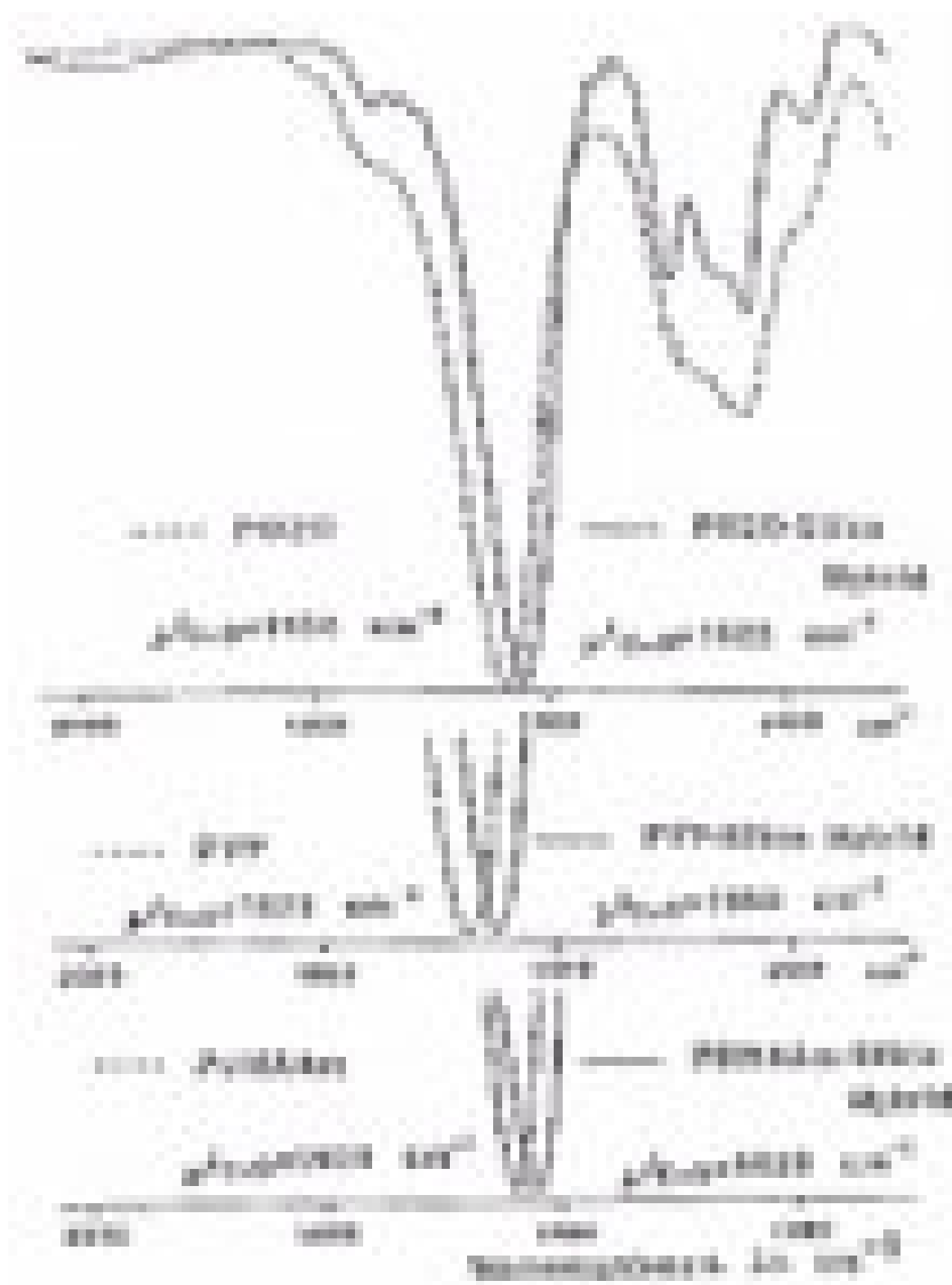


Fig. 2.1.1.7 Confronto tra gli spettri FTIR di polimeri e di ibridi

- *Simultanea interpenetrazione dei networks organici ed inorganici*

È possibile controllare la forma, la grandezza e l'omogeneità degli ibridi. Il problema maggiore è la perdita di peso del materiale dovuta all'evaporazione del solvente. Generalmente il processo sol-gel avviene in soluzioni diluite (alcol, THF, acqua in eccesso) ed un grande ammontare di solvente viene poi rimosso dopo la formazione del network. La variazione della composizione del solvente può causare disomogeneità del nanocomposito. Un modo alternativo per superare questo problema è l'uso di alcossidi di silicio modificati come materiali di partenza.

Questi alcossidi possiedono due siti reattivi distinti: il primo è dovuto all'atomo del metallo che causa la formazione del network inorganico attraverso un meccanismo di condensazione, il secondo è un gruppo polimerizzabile (Fig.2.1.1.8). Gli alchenoli ciclici sono polimerizzati mediante apertura dell'anello iniziata da un catalizzatore redox (sali di Ru^{3+}) dove i gruppi alcossilici, portando funzioni metacrilate sono polimerizzati mediante un meccanismo radicalico iniziato da radiazioni UV o da riscaldamento in presenza di un catalizzatore. Il gruppo alcossido funzionalizzato è inizialmente legato al metallo mediante un legame del tipo $\text{M}-\text{O}-\text{C}$; questo legame è idrolizzato durante lo stadio d'idrolisi-policondensazione, realizzando, così i gruppi organici polimerizzabili.

Tale processo può portare a monoliti di grandi dimensioni con buone proprietà ottiche. La reazione organica può essere controllata mediante la scelta dell'iniziatore, la sua concentrazione e dall'uso di un efficiente catalizzatore nucleofilo come NaF, che comporta una polimerizzazione inorganica veloce [111].

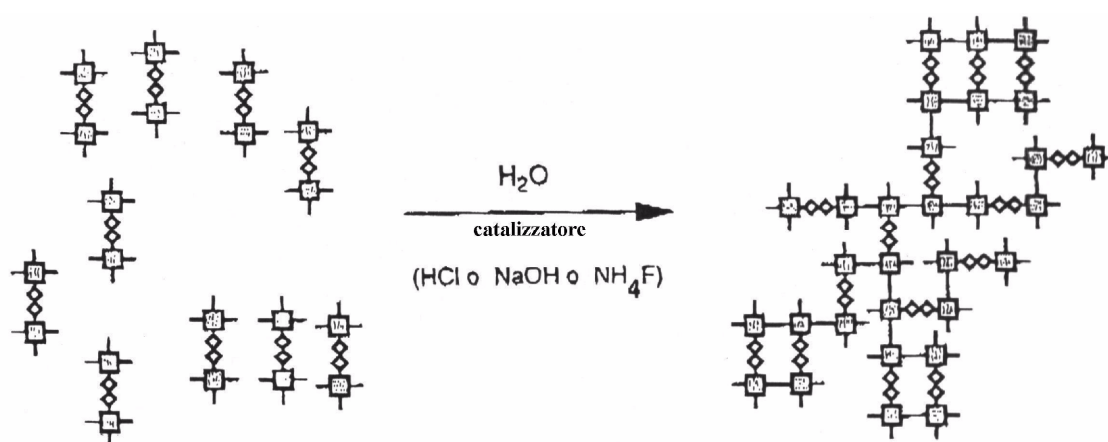


Fig. 2.1.1.8 Formazione simultanea di networks organici ed inorganici interpenetrati

2.1.2 Ibridi organo-inorganici di seconda classe

Gli ibridi di seconda classe sono costituiti da componenti legati attraverso legami chimici covalenti o ionici. Le molecole utilizzate come materiali di partenza per gli ibridi di seconda classe, possiedono due distinti gruppi funzionali: gruppi alcossilici ($R-O-H$), che, in presenza di acqua danno reazioni di idrolisi e policondensazione e legami metallo carbonio ($M-C$), che sono stabili alle reazioni di idrolisi. La natura della stabilità del legame metallo-carbonio dipende dalla natura del catione metallico. I legami organo-metallici sono stabili all'idrolisi quando il metallo è rappresentato dal Si, Hg; al contrario, i legami $M-C$ non sono stabili quando il metallo è un metallo di transizione. Pertanto, legami del tipo $M-O-C$ che sono stabili all'idrolisi, potrebbero essere il tipo di legame che si forma tra la parte organica e quella inorganica. Sono sfruttate anche reazioni di complessazione mediante leganti quali acidi organici, β -idrossiacidi, β -dichetoni ecc. Due generali metodi esistono per la produzione di questa classe di network:

- (i) la formazione sequenziale di un secondo network nella matrice di un network precedentemente formato. L'ultimo dovrebbe essere funzionalizzato a permettere l'estensione del secondo componente. Entrambi i macromeri inorganicamente od organicamente funzionalizzati polimeri inorganici di ossido di metallo possono essere usati per verificare questo primo approccio.
- (ii) la simultanea formazione di due differenti networks da precursori molecolari conduce alla funzionalità di entrambi i componenti organo-inorganici e reagendo a differenti meccanismi (poliaddizione, policondensazione, idrolisi-condensazione, ecc.). Come precursori molecolari di ibridi potrebbero essere usati alcossi-silani o alcossidi di metalli complessati [113].

• *Materiali ibridi ottenuti da alcossidi di silicio organicamente modificati*

La chimica dei derivati organici del silicio è ben nota. La sintesi e le proprietà di molecole aventi formula $Si(OR)_{4-x} R'_x$, dove R' è un sostituito alchilico o aromatico, e l'idrolizzabilità dei legami $Si-OR$ sono state ampiamente discusse. Se il gruppo R' ha una funzionalità reattiva, la chimica organica potrebbe essere applicata per tali funzionalità. Un metodo utilizzato per la sintesi di tali materiali è quello della "sintesi sequenziale". Come schematizzato in Fig.2.1.2.1, entrambi i

networks sono ottenuti in due stadi; inizialmente il network inorganico è formato per policondensazione dell'alcoossido di silicio, che porta alla formazione di un ossipolimero circondato da gruppi organici, nel secondo stadio si ha la reazione organica con i radicali organici. La possibilità di variare il rapporto materiale organico/inorganico dà origine a materiali con diverse proprietà, detti generalmente “ORMOSILs” (silicati modificati organicamente) o “ORMOCERs” (ceramici modificati organicamente), che possiedono grandi potenzialità poichè il polimero conferisce nuove proprietà al network inorganico (flessibilità, idrofobicità, modificazione dell'indice di rifrazione).

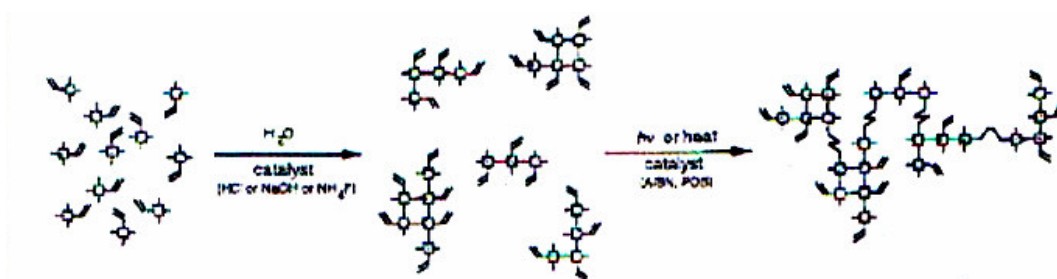


Fig. 2.1.2.1 Sintesi di materiali ibridi da atomi di silicio modificati organicamente

• *Alcossi silani polifunzionali*

Sono detti alcossisilani polifunzionali unità organiche (R') legate a due o più gruppi $\text{Si}-(\text{OR})_3$ mediante un legame $\text{Si}-\text{C}$. Quando due gruppi trialcossisilani sono legati all'unità R' , la formula generale è $(\text{RO})_3\text{Si}-R'-\text{Si}(\text{OR})_3$. I gruppi trialcossilici possono condensare in presenza di una miscela H_2O /catalizzatore per ottenere ibridi (Fig.2.1.2.2). R' può essere rappresentato da una molecola o da una macromolecola organica. Per controllare i parametri che governano la struttura dei materiali finali possono essere utilizzati precursori con differenti geometrie. I primi lavori riguardano materiali ottenuti mediante co-reazione di precursori metallo-organici (come quelli di Si o di Ti) e polimeri naturali quali polisaccaridi, cellulosa o derivati di oli vegetali.

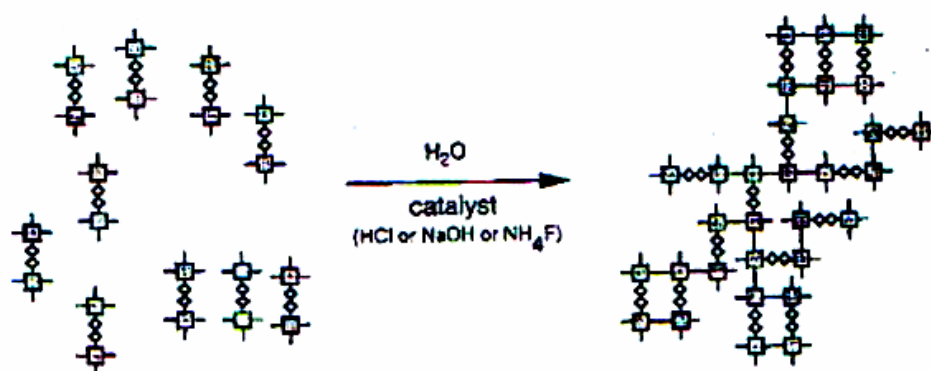


Fig. 2.1.2.2 Sintesi di materiali ibridi da alcossisilani polifunzionali

•***Ibridi basati su networks di ossidi di metalli di transizione (TMO)***

La forte reattività del legame C—TM (TM = metallo di transizione) all'idrolisi è ben nota, ma le reazioni di modificazione degli alcossidi di TM hanno consentito di andare oltre questo problema. La superficie degli ossipolimeri dei metalli di transizione ha un'alta densità di gruppi M—OH, che possono reagire con alcossidi di silicio o alcossidi di silicio modificati per formare legami M—O—Si, come si può osservare dalla Fig.2.1.2.3. L'uso di agenti complessanti è il punto chiave per la sintesi di strutture organo-inorganiche coinvolgenti metalli di transizione; quando questi complessi sono idrolizzati, i gruppi alcossidi sono rimossi, causando la formazione di metossi-polimeri. In assenza d'agenti complessanti, si ottengono precipitati. La sintesi di strutture organo-inorganiche richiede la presenza sugli agenti complessanti, di funzionalità in grado di polimerizzare. Lo schema di sintesi è analogo a quella di Fig.2.1.2.1. La polimerizzazione organica di derivati vinilici o acetonati allilici legati a TiO₂ è molto lenta. Migliori risultati si ottengono utilizzando come leganti (Fig.2.1.2.4), derivati metilacrilici come il metacrilamido salicilato (MASA) o l'acetoacetossi etil metacrilato (AAEM). Questi agenti sono aggiunti al precursore metallico (alcossido) in un secondo stadio, le polimerizzazioni organiche ed inorganiche avvengono in maniera sequenziale o anche simultaneamente se l'acqua e il radicale iniziatore sono aggiunti inizialmente. Si ottengono composti aventi aspetto simile al latte.

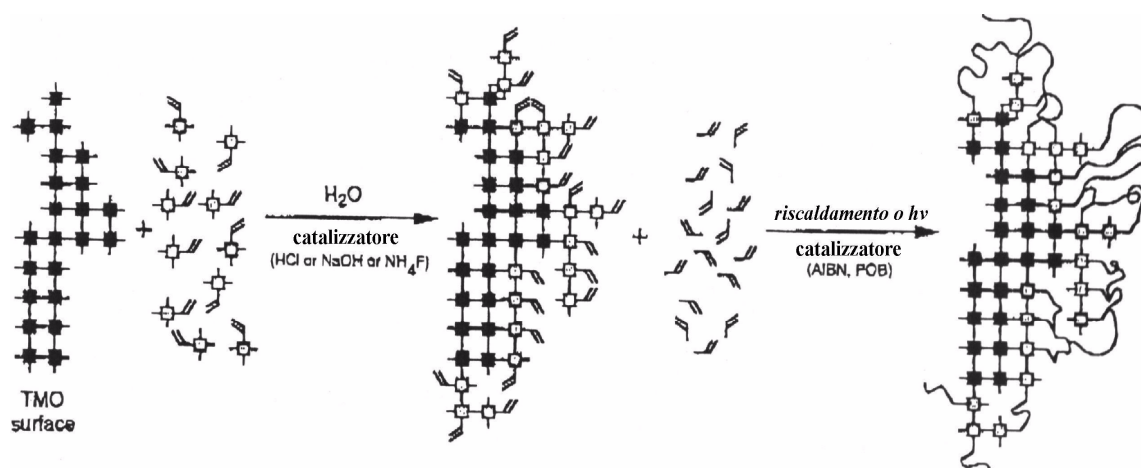
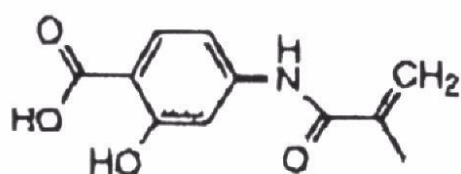
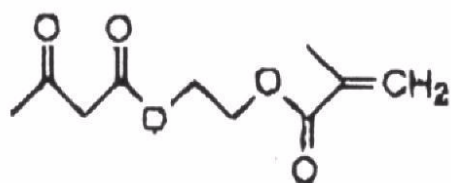


Fig. 2.1.2.3 Ibridi di seconda classe con TMO



metacrilamido salicilato (MASA)



acetoacetossi etil metacrilato (AAEM)

Fig. 2.1.2.4 Agenti complessanti per gli alcossidi: metacrilamido salicilato (MASA) e acetoacetossi etil metacrilato (AAEM)

2.2 Materiali polimerici

Un polimero è una sostanza formata da molecole di grandi dimensioni (macromolecole) la cui struttura può essere considerata derivare dall'unione, mediante legami chimici, di un gran numero di unità, generalmente dette unità monomeriche o unità ripetenti. Le unità monomeriche in un polimero possono essere di una o più specie. Nel primo caso si parla di omopolimero, nel secondo di copolimero. In Fig.2.2.1 sono mostrati tre tipi di catena polimerica:

- lineare;
- ramificata;
- reticolata.

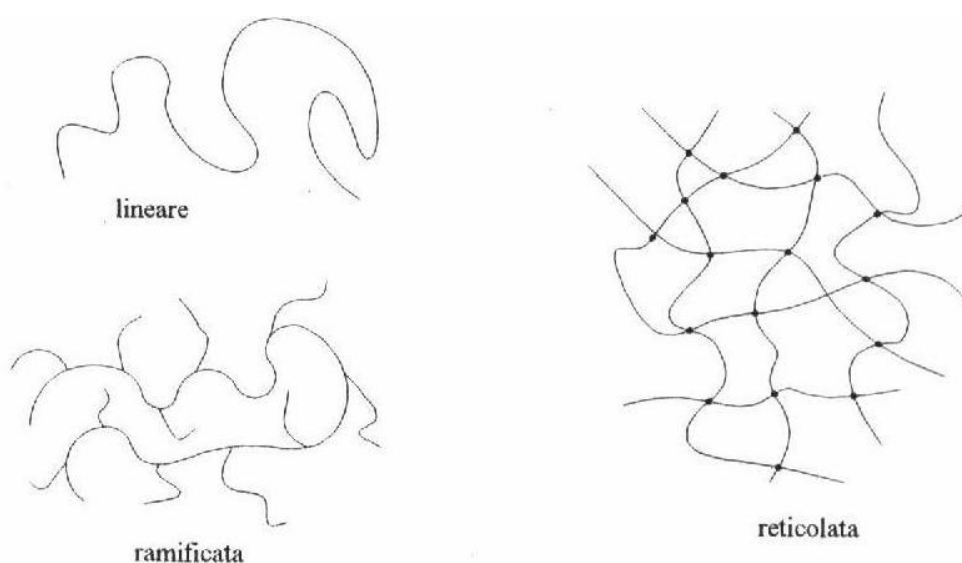


Fig. 2.2.1 I tre tipi di catena polimerica

Nei polimeri lineari tutte le unità sono legate a due e non più di due altre unità, in modo da formare una catena. Nel copolimero se le unità, si alternano, nella catena in maniera casuale, il copolimero è detto statistico. Copolimeri con caratteristiche particolari si hanno quando le unità si raggruppano nella catena in modo da formare dei blocchi; in questo caso si parla di copolimeri a blocchi. Si dicono copolimeri ad innesto, copolimeri ramificati in cui la catena principale e le ramificazioni hanno natura chimica diversa [117]. Nei polimeri reticolati alcune delle ramificazioni appartengono a due catene contemporaneamente. Le proprietà macroscopiche dei polimeri sono fortemente influenzate dalla classe d'appartenenza; per esempio i polimeri lineari sono, solubili in alcuni solventi e rammolliscono per riscaldamento

fino a diventare liquidi. I polimeri reticolati sono, invece, sempre insolubili. In seguito a processi di sintesi dei polimeri si producono macromolecole di lunghezza diversa, a cui competono pesi molecolari diversi. Il peso molecolare di un polimero è uguale al peso molecolare del monomero moltiplicato per il grado di polimerizzazione (n). Quest'ultimo è definito come il numero di unità monometriche che costituisce la macromolecola. A seguito della complessità dei meccanismi coinvolti in una reazione di polimerizzazione, la massa di polimero di solito non contiene una sola macromolecola, ma molte, e il grado di polimerizzazione non è uguale per tutte [1]. In genere il peso molecolare di una massa di polimero è rappresentabile con la curva a campana come mostrato dalla Fig.2.2.2.

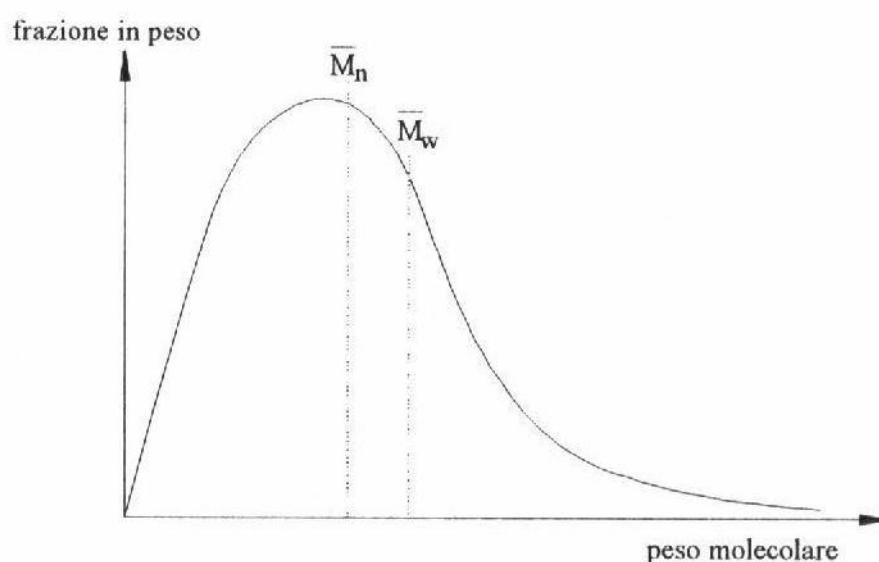


Fig. 2.2.2 Distribuzione a campana dei pesi molecolari di un generico polimero

L'aumento del peso molecolare influenza alcune proprietà fisiche del polimero. Di solito nelle applicazioni biomediche sono richiesti sia un alto peso molecolare, sia una relativamente stretta distribuzione, il che garantisce buone proprietà meccaniche e una bassa dispersione della distribuzione dei pesi molecolari. In particolare è importante che sia molto limitato, o meglio assente, il monomero residuo in quanto è solitamente tossico e in qualche caso anche cancerogeno. Ogni singola macromolecola, essendo molto lunga, può assumere nello spazio una conformazione molto contorta. La forma media delle molecole dei polimeri amorfi lineari con catene sufficientemente flessibili è quella di un gomitolo, in cui la distribuzione

degli atomi della catena è casuale e variabile nel tempo; si parla, di gomitolo statico [116]. Affinché le lunghe catene polimeriche possano raggiungere la conformazione a gomitolo è necessario che abbiano mobilità elevata, quale si ottiene quando il materiale è allo stato fuso oppure è in soluzione. Se la temperatura viene ridotta si determina una riduzione di mobilità che non procede uniformemente durante il raffreddamento. I polimeri strutturalmente irregolari non hanno la possibilità di cristallizzare, quindi rimangono allo stato amorfo anche portandoli a basse temperature. In tutti i polimeri non cristallizzabili la mobilità molecolare si riduce notevolmente in un ristretto intervallo di temperatura; a temperature inferiori a quest'intervallo il polimero si presenta come una sostanza dura, quasi sempre trasparente, di modulo elastico relativamente elevato. Questo stato fisico è detto vetroso. Si conviene che il passaggio dallo stato liquido a quello vetroso avvenga a una temperatura cui si dà il nome di *temperatura di transizione vetroso*, T_g . Per determinare il valore di T_g è sufficiente esaminare la dipendenza della temperatura di una qualunque grandezza fisica sensibile alle variazioni della mobilità molecolare. Grandezze comunemente usate sono il modulo elastico, il calore specifico o il volume specifico come mostrato nella Fig.2.2.3.

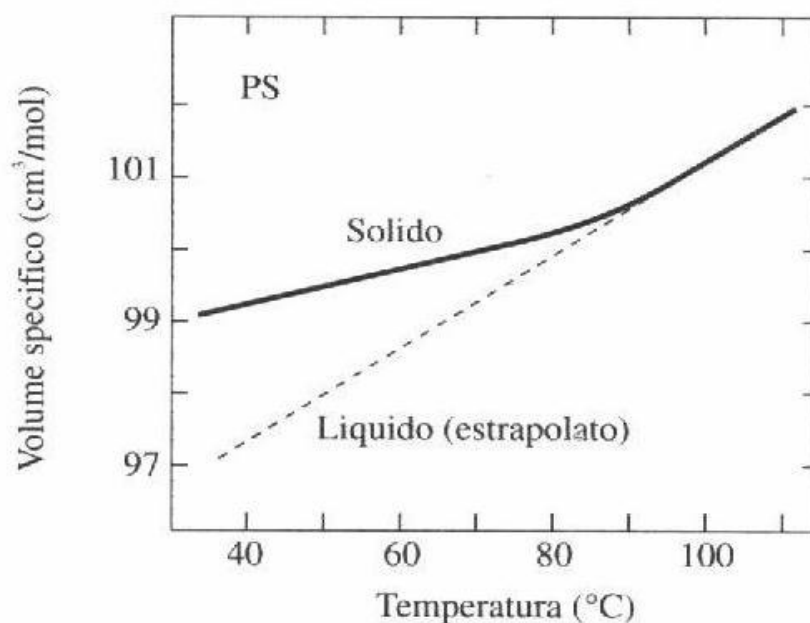


Fig. 2.2.3 Volume specifico del polistirolo atattico in funzione della temperatura

Si ammette che il volume specifico di un polimero sia costituito dal volume realmente occupato dalle molecole e da un volume non occupato, detto volume libero. La transizione vetrosa è spiegata ammettendo che al valore della T_g si abbia un aumento del volume libero con conseguente aumento della distanza media tra le catene. Poiché la transizione si verifica quando le macromolecole hanno raggiunto una sufficiente mobilità, è evidente che catene molto flessibili liquefano a temperature basse. Dalla tabella III si osserva che la transizione nella maggior parte dei polimeri avviene in un intervallo di temperatura tra -100 e 180 °C.

Valori delle temperature di transizione vetrosa (T_g) e di fusione (T_m) per vari polimeri.

Polimero	T_m (°C)	T_g (°C)
Polietilene (bassa densità)	115	-120
Polietilene (alta densità)	135	-120
Polivinilcloruro		75
Polipropilene	170	-15
Poliacrilonitrile		105
Polistirene		100
Polimetilmetacrilato		105
Acetaliche	180	-85
Nylon 66	265	50
Policarbonato		145
Poliestere	255	75
Silicone		-120
Polibutadiene		-90
Poliisoprene		-70
Policloroprene		-50

Tabella III

Come si vede dalla Fig.2.2.4 il valore della transizione vetrosa è influenzato dal peso molecolare; infatti, all'aumentare di esso, si ha una riduzione della mobilità e conseguentemente un aumento della T_g .

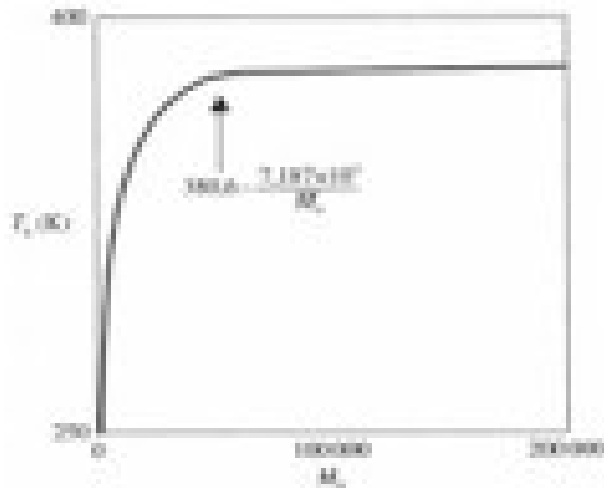


Fig. 2.2.4 L'aumentare delle dimensioni delle macromolecole, e quindi del peso molecolare, produce un aumento della temperatura di transizione vetrosa

I materiali polimerici sono classificabili, in base alle loro proprietà termomeccaniche, in termoplastici e in termoindurenti.

I primi, a catena lineare o ramificata, sono modellabili plasticamente un numero illimitato di volte, perché ciò avvenga in un certo campo di temperature. I secondi invece, a catena reticolata, oltre un certo stato del processo d'ottenimento non sono più modellabili e anzi è proprio il calore che determina inevitabilmente l'indurimento del polimero [1]. Nel caso in cui il materiale sia lineare amorfo all'aumentare della temperatura si osservano due transizioni in corrispondenza di due successivi intervalli di temperatura. Il primo, nell'intorno della temperatura di trazione vetrosa (T_g), è caratteristico della modifica delle proprietà del materiale che da vetroso diventa gommoso. Il secondo intervallo, nell'intorno della temperatura di rammollimento (T_r), divide il campo di proprietà di un polimero gommoso da quello di un polimero liquido, quindi lavorabile anche se molto viscoso. Oltre la temperatura limite di stabilità chimica (T_L), il polimero si degrada in quanto si rompono i legami chimici e quindi si è in presenza di un altro materiale Fig.2.2.5.



Fig. 2.2.5 Andamento del modulo di elasticità in funzione della temperatura per un polimero lineare amorfo (1), parzialmente cristallino (2) e reticolato (3)

Nel caso di un materiale polimerico parzialmente cristallino la transizione vetrosa modifica poco le proprietà meccaniche che invece cadono moltissimo allorché il reticolo cristallino cede, cioè alla temperatura di fusione (T_m). Nel caso, infine, di un polimero reticolato termoindurente non ci sono significative variazioni di proprietà con la temperatura fino al limite di stabilità chimica. La temperatura di transizione vetrosa è un dato di grande interesse tecnologico e applicativo. In particolare, polimeri con la T_g particolarmente bassa si comporteranno a temperature ambiente da gomme, avranno cioè modesta rigidità, ma saranno molto tenaci e capaci di sopportare grandissime deformazioni. Polimeri con T_g superiore alla temperatura ambiente saranno invece vetrosi, cioè molto rigidi e scarsamente deformabili, quindi fragili. In genere dunque, secondo le proprietà meccaniche richieste, occorrerà conoscere lo stato del materiale alla temperatura d'esercizio. In particolare, nel caso di materiali polimerici da impiantare nel corpo umano, occorre sapere se la T_g è superiore o inferiore a 37°C . A seconda che il polimero sia un termoplastico oppure un termoindurente, sotto l'azione di forze esterne, la struttura molecolare si deforma in maniera diversa. Quando si applica un certo carico le catene si distendono ma nel materiale termoplastico è consentito uno scorrimento reciproco, che non viene recuperato quando il carico è rimosso; nel termoindurente, invece, la situazione ritorna uguale a quella iniziale, grazie al forte legame esistente. Per valutare le proprietà meccaniche di un polimero, un provino viene sottoposto ad un carico

crescente con velocità di deformazione approssimativamente costante, al fine di determinare il modulo elastico longitudinale o modulo di Young, E, definito come:

$$E = P/A\varepsilon$$

dove ε = deformazione unitaria subita dal polimero

A = superficie del provino

P = carico

L'allungamento ε aumenta all'aumentare della temperatura per cui il modulo elastico diminuisce all'aumentare di T. In definitiva, i polimeri presentano proprietà fortemente dipendenti dalla temperatura di prova e dalla velocità di deformazione. I materiali polimerici sono materiali viscoelastici, si definisce tale comportamento quando la relazione che lega lo sforzo alla deformazione è dipendente dal tempo. Ciò significa che la velocità con cui si deforma il materiale è determinante per la sua caratterizzazione. In genere un materiale viscoelastico ha un modulo d'elasticità crescente con la velocità di deformazione ($d\varepsilon/dt$) quindi per alte velocità di deformazione il materiale assume comportamento sempre più elastico, mentre per basse velocità di deformazione il materiale assume un comportamento più plastico. I polimeri termoplastici hanno diagrammi sforzo-deformazione che dipendono sia dalla velocità di deformazione, sia dalla temperatura. Le curve, come mostrato in Fig.2.2.6, indicano che il polimero diventa più fragile all'aumentare della velocità di deformazione e/o al diminuire della temperatura e viceversa. I polimeri con catene lineari o ramificate hanno proprietà meccaniche inferiori ai polimeri reticolati; le catene lineari e ramificate sono legate fra loro da legami deboli del tipo Van der Waals, dipolo-dipolo, ecc, che consentono, quando il polimero è sottoposto ad una sollecitazione, lo scorrimento delle catene l'uno rispetto all'altro.

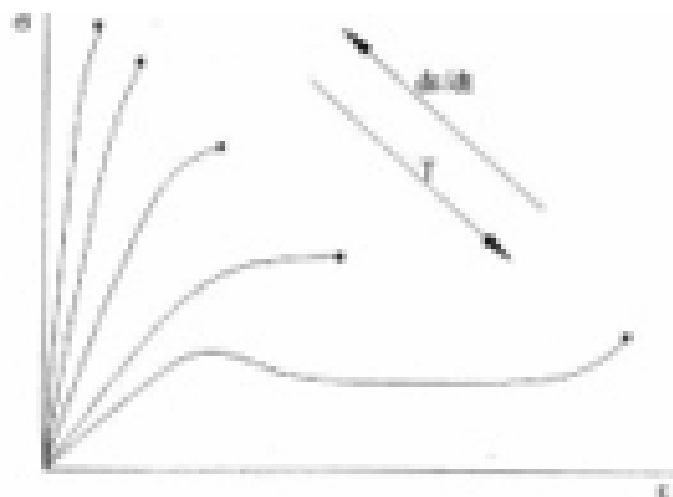


Fig. 2.2.6 Tipiche curve sforzo-deformazione per un polimero termoplastico

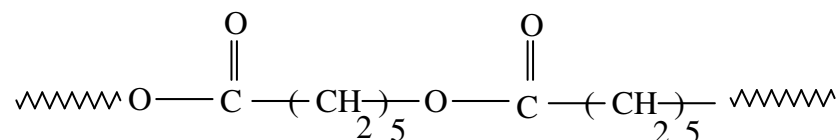
I materiali polimerici hanno vastissime applicazioni nel settore della bioingegneria. I polimeri sintetici hanno una struttura chimica molto simile ai polimeri naturali contenuti nei tessuti biologici, ad esempio il collagene, e in alcuni casi è possibile ottenere dei legami chimici tra le catene dei polimeri naturali e quelle dei polimeri sintetici. In questo senso i materiali polimerici possono avere una buona biocompatibilità intesa come interazione che promuove l'accettazione del materiale da parte dell'organismo. In relazione alla loro applicazione, possono essere utilizzati polimeri biodegradabili e non biodegradabili. I polimeri biodegradabili sono indicati per applicazioni che richiedono solo una presenza temporanea di un impianto polimerico come materiali per suture, membrane periodontali, trapianti vascolari temporanei e sistemi a rilascio di farmaci. Tra i polimeri biodegradabili ci sono omopolimeri e copolimeri basati su acido polilattico (PLA), acido poliglicolico (PGA) e poli- ϵ -caprolattone (PCL).

Un promettente esempio applicativo in ortopedia di tali polimeri è quello di viti, placche e chiodi intramidollari che, invece di essere rimossi quando hanno esaurito la loro funzione stabilizzante delle ossa fratturate, vengono riassorbiti ed eliminati dall'organismo ospite. Il problema principale associato con l'uso di tali polimeri per osteosintesi, è il controllo della velocità di degradazione che deve essere adeguata al processo di guarigione dell'osso, infatti, durante la degradazione, le proprietà meccaniche del polimero peggiorano e ciò deve avvenire solo contemporaneamente alla mineralizzazione del callo osseo. Nel presente lavoro di tesi è stato utilizzato il PCL, in quanto è un polimero bioassorbibile [118] ed inoltre è stato considerato

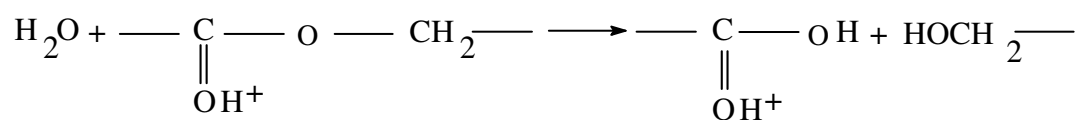
come un potenziale substrato per ampie applicazioni, come sistemi a rilascio di farmaci [119,120], tessuti ingegnerizzati [121] e scaffolds per la crescita di fibroblasti ed osteoblasti [122].

2.3 Componente organica: Policaprolattone

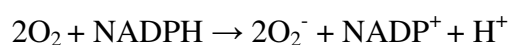
Il poli-ε-caprolattone (PCL) è un poliestere alifatico appartenete ad un importante gruppo di termoplastici ed ha recentemente ricevuto molta attenzione per la sua flessibilità e biodegradabilità, avente la seguente formula:



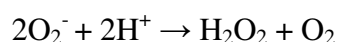
E' un polimero idrofobo, non tossico e sufficientemente permeabile con i tessuti viventi. Ha una struttura semicristallina, con una temperatura di fusione T_m pari a 63°C e una T_g inferiore a -60°C , pertanto a temperatura ambiente è in uno stato gommoso. Aggiunto ad altri poliesteri alifatici come polilattico (PLA) e poliglicolico (PGA), il PCL e i suoi copolimeri hanno buone applicazioni commerciali [123,124]. Le applicazioni del PCL, comunque, sono state ristrette per il suo basso punto di fusione, poca stabilità, e tendenza a crack quando stressato [125]. Grazie, invece, alla sua biodegradabilità e non tossicità, di gran interesse è l'utilizzo di dispositivi polimerici per il rilascio controllato di farmaci. Materiali ibridi organo-inorganici di PCL sono un attrattivo mezzo di controllo simultaneo di queste proprietà. Come riportato in letteratura [126], compositi vetro-polimero costituiti da vetro a base di fosforo e dal poli-ε-caprolattone sono utilizzati con successo per la costruzione di impianti protesici nei conigli. Essendo il poli-ε-caprolattone un poliestere biodegradabile, è necessario conoscere i possibili meccanismi di degradazione in quanto essi possono provocare la perdita di funzionalità dell'impianto stesso. La degradazione di un polimero, in genere, è dovuta ai processi di sterilizzazione, a effetti chimici o a effetti dell'ambiente biologico [1]. Studi riguardanti la degradazione del poli-ε-caprolattone hanno evidenziato che, essa è dovuta all'idrolisi non enzimatica dei gruppi esteri, un processo autocatalizzato dall'acido carbossilico del polimero [127].



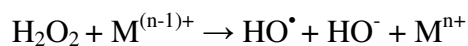
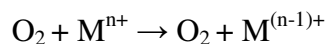
E' inoltre emerso il ruolo dei radicali liberi dell'ossigeno, in quanto essi sono coinvolti in varie patologie umane. Nel considerare il ruolo di questi, bisogna tenere conto del fatto che la biocompatibilità di un dato materiale è descritta in termini di risposta infiammatoria acuta e cronica, dovuta all'impianto di esso. La risposta infiammatoria acuta è mediata da cambiamenti della permeabilità dei vasi, che permettono ai leucociti polimorfonucleati di migrare nel sito infiammato. Questi neutrofili sono seguiti dai monociti che poi si differenziano in macrofagi [128]. I macrofagi, adeguatamente stimolati, producono copiose quantità d'anione superossido (O_2^-) e perossido d'idrogeno (H_2O_2). Questo fenomeno è noto come "esplosione respiratoria". La reazione primaria di quest'esplosione è la riduzione di O_2 catalizzata dalla NADPH ossidasi:



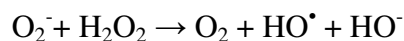
i radicali O_2^- producono, in una reazione catalizzata dall'enzima superossido dismutasi (SOD), H_2O_2 :



In presenza di ioni metallici si ha la formazione di radicali HO^\bullet molto reattivi:



Semplificando si ottiene:



Per evidenziare l'effetto dei radicali liberi, come riportato in letteratura [128], è stato utilizzato il reattivo di Fenton, una miscela di $Fe(II)$ e H_2O_2 , affinché fossero prodotti i radicali HO^\bullet



Da questi studi è stato dedotto che a causa della degradazione idrolitica dei gruppi esteri si ha una diminuzione del peso molecolare; inoltre, si registra un aumento del grado di cristallinità che è attribuibile al fatto che si ha la formazione di catene più corte, quindi più mobili. La maggiore velocità di cambiamento della cristallinità nel sistema radicalico è probabilmente dovuta alla scissione delle catene polimeriche causata dalla degradazione idrolitica che coinvolge un attacco chimico alla fase amorfa, questa degradazione inizia nella fase amorfa e poi continua in quella cristallina. Quando il polimero è incubato nelle soluzioni contenenti i radicali liberi, le molecole d'acqua con i radicali diffondono attraverso la fase amorfa più facilmente rispetto a quanto accade nella compatta fase cristallina.

Si assume che i radicali HO[•] reagiscono con il poli-ε-caprolattone estraendo un atomo di idrogeno adiacente al carbonile elettron-attrattore, infatti, il poli-ε-caprolattone ha un atomo di idrogeno facilmente perdibile sul carbonio in α al gruppo carbossilico:

$$\text{R}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}_2-\text{COOR}^* + \text{HO}^\bullet \rightarrow \text{R}-(\text{CH}_2)_4-\text{CH}-\text{COOR}^* + \text{HO}-\text{H}$$

2.4 Componente inorganica: ZrO_2 - TiO_2

In questo lavoro di tesi sono stati sintetizzati materiali ibridi per i quali sono state considerate due tipi di matrici inorganiche. Una prima serie di materiali si basa su ZrO_2 stabilizzato con Y_2O_3 al 5% in peso. Lo studio di materiali a base di ZrO_2 stabilizzato con Y_2O_3 [129] ha rivelato che le proprietà di stabilità chimica e dimensionale, forza e durezza meccanica accoppiate all'elasticità rendono questi materiali ottimi biomateriali ceramici.

Nei primi stadi di sviluppo furono testate diverse soluzioni solide ($\text{ZrO}_2\text{-MgO}$, $\text{ZrO}_2\text{-CaO}$, $\text{ZrO}_2\text{-Y}_2\text{O}_3$) per applicazioni biomediche, ma successivamente la ricerca fu focalizzata su ceramici $\text{ZrO}_2\text{-Y}_2\text{O}_3$ caratterizzati da microstrutture sottili e granulari conosciute come Policristalli Tetragonali di Zirconio (TZP). L'ossido di zirconio infatti risulta essere polimorfo e si trova quindi in tre forme: monoclinico (M), cubico (C) e tetragonale (T). Esso risulta monoclinico a temperatura ambiente, tetragonale a più alte temperature (maggiori di 1170°C) ed oltre i 2000°C diventa cubico. Durante il raffreddamento avviene una trasformazione da tetragonale a monoclinica a cui è associato un'espansione del volume di circa il 3-4%. Lo stress generato dall'espansione volumetrica determina, a temperatura ambiente, la rottura del ceramico in pezzi comportando una riduzione delle dimensioni, di densità e durezza. Solo successivamente fu dimostrata la fattibilità della stabilizzazione della fase cubica a temperatura ambiente aggiungendo allo zirconio piccole quantità di CaO . L'aggiunta di ossidi stabilizzanti permette di generare materiali multifasici noti come zirconio parzialmente stabilizzato (PSZ): esso consiste nella maggior fase di zirconio cubico con zirconio monoclinico e tetragonale precipitati come minor fase; gli ossidi stabilizzanti sono CaO , MgO , ClO_2 , Y_2O_3 [130]. PSZ possono essere ottenuti dal sistema $\text{ZrO}_2\text{-Y}_2\text{O}_3$. In tale sistema è anche possibile ottenere ceramici formati a temperatura ambiente solo con fase tetragonale chiamati TZP. L'ittrio quindi ha la funzione di stabilizzare la struttura tetragonale dello zirconio a temperatura ambiente. Lo zirconio stabilizzato in fase tetragonale risulta il più utilizzato nelle applicazioni soprattutto come biomateriale, in quanto mostra una combinazione unica di proprietà come una buona resistenza all'ossidazione, coefficiente di espansione termico simile a quello delle leghe metalliche, un modulo elastico simile all'acciaio e uno dei più alti valori di resistenza alla frattura dei materiali ceramici. Lo zirconio inoltre mostra un'ottima bioattività, ciò è dovuto ai

gruppi ossidrilici legati allo zirconio che inducono alla nucleazione dell'apatite in superficie una volta che il materiale viene immerso in una soluzione simulante il plasma sanguigno SBF.

Per la seconda serie di materiali è stata scelta come componente inorganica il TiO_2 , in quanto la combinazione della sua bioattività e delle sue proprietà meccaniche lo rende un buon candidato per le applicazioni biomediche. La formazione di uno strato di idrossiapatite sulla superficie del materiale può essere ottenuta mediante l'incubazione di quest'ultimo in SBF, questo è un metodo semplice ed economico. L'idrossiapatite è sempre più utilizzata nei materiali per applicazioni mediche per il fatto che la sua composizione chimica è molto simile a quella dei componenti dell'osso umano [131,132]. Inoltre, è stato accertato che la bioattività del titanio è attribuita alla superficie del film di TiO_2 che di solito è molto stabile e conduce alla bioinertizzazione del titanio. Gel monolitici TiO_2 possono essere ottenuti mediante la tecnica sol-gel quando l'idrolisi di alcossidi di titanio avviene in presenza di acido acetico. L'acido carbossilico non agisce solo come catalizzatore ma come agente chelante e cambia il precursore alcossido a livello molecolare quindi modificando l'intero processo di idrolisi e condensazione [133]. A differenza di altri materiali bioattivi, come i bioglass, il titanio si osteointegra sulle superfici e nei tessuti, invece di legarsi con l'osso.

Tre aspetti nel sistema impianto-tessuto sono importanti per avere un risultato positivo: il materiale da impiantare e il tessuto adiacente [134,135], la zona di interfaccia tra l'impianto e il tessuto, l'effetto dell'impianto e dei suoi prodotti a livello locale e sistemico [136]. L'integrità interfacciale dipende da diversi fattori quali il materiale, la meccanica, la chimica, la biologia e da fattori ambientali che cambiano in vivo in funzione del tempo. In generale, i metalli e i ceramici sono usati in implantologia, sia da soli sia come materiali ibridi. Materiali a base di titanio sono ben tollerati dall'organismo per la presenza sulla loro superficie di gruppi OH che favoriscono l'osteointegrazione grazie a particolari meccanismi di scambio ionico che si vengono ad instaurare [137]. Comunque, la bassa velocità di dissoluzione e inerzia chimica dei prodotti di dissoluzione del titanio permette l'osso di proliferare e di osteointegrarsi con il titanio. In aggiunta, è stato accertato che TiO_2 con l'alta costante dielettrica inibisce il movimento delle cellule alla superficie dell'impianto e ciò potrebbe giocare un importante ruolo nel facilitare l'osteointegrazione [140].

I fattori importanti per l'osteoiduzione sono: 1) la composizione chimica; 2) le proprietà specifiche di dissoluzione; 3) la superficie morfologica.

Nel 1920 Albee e Morrison hanno riportato che la capacità di saldarsi dell'osso era accelerata dall'utilizzo del "tricalciofosfato" (CaP) [138]. Comunque, tale materiale venne usato alla fine degli anni 60 negli impianti al posto dell'osso [139]. L'utilizzo del CaP come materiale salutare permetteva di ottenere diversi vantaggi come: 1) mancanza della formazione di tessuto fibroso con l'osso, 2) formazione di una forte interazione tra l'impianto e il tessuto osseo, 3) crescita rapida del tessuto osseo, motivo per cui si riduce il periodo di convalescenza.

CAPITOLO III

SISTEMI A RILASCIO CONTROLLATO DI FARMACI

3.1 La tecnologia “Drug Delivery”

La tecnologia drug delivery, come settore appartenente alla sfera farmaceutica, è di origine piuttosto recente. Ha avuto la sua origine tra il 1950 e 1960, quando apparve la prima forma orale a rilascio sostenuto di farmaco; la più conosciuta è stata probabilmente la capsula Spansule sviluppata dai laboratori Smith Kline & French. All'inizio, la tecnologia drug delivery aveva come principale obiettivo quello di prolungare gli effetti del dosaggio orale della medicazione per esempio per provvedere utilmente a prolungare il sollievo dei sintomi. È dal 1970 in poi che la tecnologia drug delivery inizia ad evolvere in una branca della scienza farmaceutica, capace di risolvere alcuni dei più seri problemi della farmacoterapia.

I sistemi a rilascio di farmaci hanno lo scopo principale di permettere la somministrazione locale dei farmaci, quest'ultima offre numerosi vantaggi rispetto alla somministrazione sistemica. I farmaci somministrati sistemicamente sono assorbiti nel flusso sanguigno e distribuiti attraverso il sistema circolatorio, in questo caso l'entità della risposta terapeutica dipenderà dalla quantità di principio attivo che raggiunge la circolazione sistemica e quindi l'obiettivo terapeutico, ed è strettamente correlata alla via di somministrazione impiegata (via orale, via inalatoria etc.) che, a sua volta, ha effetti sull'assorbimento e sull'eliminazione del farmaco. Quando la somministrazione è locale si limitano gli eventuali effetti avversi della somministrazione sistemica, dovuti, ad esempio, alla tossicità sistemica intrinseca del principio attivo dell'antibiotico oppure degli eccipienti, sostanze che non presentano alcuna attività terapeutica, sono infatti farmacologicamente inattivi, ma che rientrano nella composizione di un farmaco, in quanto veicolano i principi attivi, ad esempio, favorendone l'assorbimento. Attraverso la somministrazione locale si assicura una maggiore concentrazione di principio attivo e quindi un trattamento continuo sulla parte interessata nonché un'ottimizzazione dell'assorbimento del farmaco, limitando gli effetti collaterali del farmaco stesso [140,141]. Sono stati ideati dei biomateriali per il sistema a rilascio controllato di farmaci. Un rilascio controllato ha determinato notevole interesse negli ultimi anni, in particolare per l'utilizzo di sistemi biodegradabili. Un problema comune alla maggior parte dei

sistemi è che essi mostrano o una costante velocità di rilascio o il rilascio è dipendente dalla degradazione del sistema con il tempo [142]. Il destino della superficie del biomateriale è dipendente da diversi fattori includendo l'assorbimento delle proteine della matrice. Quando la superficie del biomateriale è esposta ad un ambiente biologico essa rapidamente acquista uno strato di glicoproteine, come l'albumina, collagene e fibronectina. Gli impianti di biomateriali provvedono un adeguato substrato adesivo per la colonizzazione batterica. I batteri hanno l'abilità a colonizzare rapidamente la superficie dei biomateriali, prevenendo così l'attacco delle cellule tissutali. Le cellule tissutali competono con le cellule batteriche per la colonizzazione della superficie del materiale, riducendo così la risposta dell'ospite e l'integrazione tissutale mentre cresce il rischio dell'infezione. Un'infezione ossea può espandersi rapidamente e può coinvolgere lo spazio midollare, corteccia e periostio. In certi casi l'infezione è capace di indurre infiammazione cronica e necrosi tissutale. L'osteomelite è una condizione clinica che è difficile da trattare e così il maggior sforzo va nell'evitare il suo sviluppo nel periodo pre e post-operatorio. I maggiori problemi sono associati con la poca distribuzione di antibiotico al sito d'infezione dovuta alla limitata circolazione nel circostante tessuto scheletrico [143]. La resistenza degli impianti alla colonizzazione batterica può essere aumentata modificando la superficie del materiale. Per esempio, i poliuretani possono essere modificati con un aumento della superficie idrofila che sembra ridurre la crescita dello *Staphylococcus epidermidis*. L'idrofilicità della superficie può essere aumentata da tecniche di irradiazione che introducono gruppi funzionali alla superficie dei materiali polimerici [144]. Un altro approccio è stato quello di incorporare agenti antimicrobici come la Flucloxacillin nel poliuretano oppure iodine nel polivenil fluoride [145]. Sotto normali condizioni le difese dell'ospite sono in grado di affrontare l'infezione, ma in casi di un trauma grave può accadere la rapida colonizzazione dei batteri [146,147]. Come risultato il processo di riparazione può essere ritardato dovuto al povero numero di cellule e alla ridotta attività cellulare. In questi casi, il rilascio di fattori di stimolazione per l'osso in combinazione con un antibiotico possono avere l'ulteriore vantaggio di stimolare cellule osteogeniche a proliferare e a differenziarsi [107,148].

È bene ricordare che la tecnologia a rilascio di farmaci non si limita a trattamenti terapeutici ma può essere utilizzata in differenti applicazioni, come, per esempio, in rilascio di prodotti in agricoltura, in rilascio di prodotti antispurco nelle tinture per

barche, nei cibi per animali, negli antiparassiti per animali, solo per citare i casi più conosciuti. Questi prodotti richiedono speciali design, ma meno cura riguardo l'omogeneità è la purezza dei componenti rispetto ai prodotti per uso umano. Il vantaggio è che per questi prodotti c'è un'ampia scelta di polimeri utilizzabili, con una più alta probabilità di successo e minor costi.

3.2 Terminologia appropriata del Drug Delivery

Con il termine Drug Delivery System (DDS) s'intende un sistema sofisticato che può incorporare una, o una combinazione, di tecnologie avanzate quali :

1. Sistema a rilascio di farmaco a velocità sostenuta: permettendo di prolungare l'effetto terapeutico del farmaco per un esteso periodo di tempo.
2. Sistema a rilascio di ordine zero: il farmaco rilasciato non varia con il tempo, dato che il sistema permette di mantenere un livello (relativamente) costante nel corpo per un esteso periodo.
3. Sistema a rilascio variabile: il sistema rilascia il farmaco a velocità variabile in maniera da farlo combaciare, per esempio, ai bioritmi naturali.
4. Sistema a rilascio bio-reattivo: il sistema modula il rilascio di farmaco in risposta a uno stimolo, per esempio a quello cardiaco.
5. Sistema a rilascio di farmaco a velocità controllata: il sistema rilascia il farmaco a una predeterminata velocità, sistemicamente o localmente, per uno specifico periodo di tempo.

3.3 Sistema a rilascio controllato di farmaci (SRC)

Lo scopo di sviluppare sistemi a rilascio controllato è quello di ridurre la frequenza del dosaggio o/e aumentare l'efficacia del farmaco attraverso la circoscrizione del sito d'azione, di conseguenza riducendo la dose richiesta o provvedendo a un rilascio di farmaci uniforme. Se si immagina il sistema di rilascio ideale, esso dovrebbe avere due requisiti. In primo luogo esso deve contenere una singola dose per l'intera durata del trattamento sia esso per giorni o settimane, come nel caso delle infezioni, sia esso per l'intera vita del paziente, come per l'ipertensione o per il diabete. Il secondo requisito di un sistema a rilascio controllato è che il sistema deve rilasciare l'entità attiva direttamente sul sito d'azione, di conseguenza minimizzando o eliminando gli effetti collaterali.

È ovvio che questo sistema di rilascio avrà requisiti differenti per diversi stati di disagio e per differenti farmaci.

Il rilascio controllato denota che il sistema sarà in grado di fornire un effettivo controllo terapeutico che sia di natura temporale, spaziale o entrambi. In altre parole, il sistema provvede a controllare la concentrazione di farmaco nel tessuto bersaglio. Un rilascio di ordine zero costituisce un rilascio di un farmaco dalla forma di dosaggio che è indipendente dall'ammontare del farmaco nel sistema di rilascio, ovvero si ha in tal caso una velocità di rilascio costante. Un rilascio sostenuto costituisce, invece, qualunque forma di dosaggio che provvede alla cura su un tempo esteso, in tal caso il rilascio seguirà una cinetica di primo ordine (dipendente dalla concentrazione) ma di tipo lenta che tende cioè alla cinetica di ordine zero propria del rilascio controllato.

Il presente lavoro di tesi focalizza l'attenzione sui sistemi a rilascio controllato di farmaci (SRC). Le formulazioni specificamente definite "a rilascio controllato" sono caratterizzate dalla precisione con cui il farmaco viene rilasciato in modo che l'ottenimento della cinetica desiderata, generalmente, ma non necessariamente di ordine zero, non sia più un fatto occasionale, ma una prestazione rigidamente garantita.

$$Q = K \cdot t^n$$

dove Q è la quota di farmaco ceduta dalla forma farmaceutica, al tempo t

K è la costante di cessione

Se $n=0 \Rightarrow Q=K$ cinetica di ordine zero

Quantità di farmaco assorbita bilancia esattamente la quantità di farmaco eliminata

Se $n=1 \Rightarrow Q$ dipende dal tempo, cinetica del primo ordine

Gli obiettivi di un SRC sono diversi:

1. mantenimento dei livelli plasmatici di farmaco nell'intervallo terapeuticamente utile;
2. mantenimento della efficacia terapeutica per tutto il ciclo programmato;
3. riduzione della quantità di farmaco somministrata;
4. drastica riduzione o eliminazione degli effetti collaterali;
5. riduzione del disagio derivante al paziente da ripetute somministrazioni di farmaco e aumento della sua *compliance*;
6. possibilità di efficacia terapeutica anche in aree non privilegiate dalla disponibilità costante di controllo medico.

La Fig.3.3.1 mostra come varia la concentrazione di farmaco nel sangue in funzione del tempo nel rilascio controllato di ordine zero, nel rilascio con cinetica di primo ordine, e nel rilascio da una capsula convenzionale.

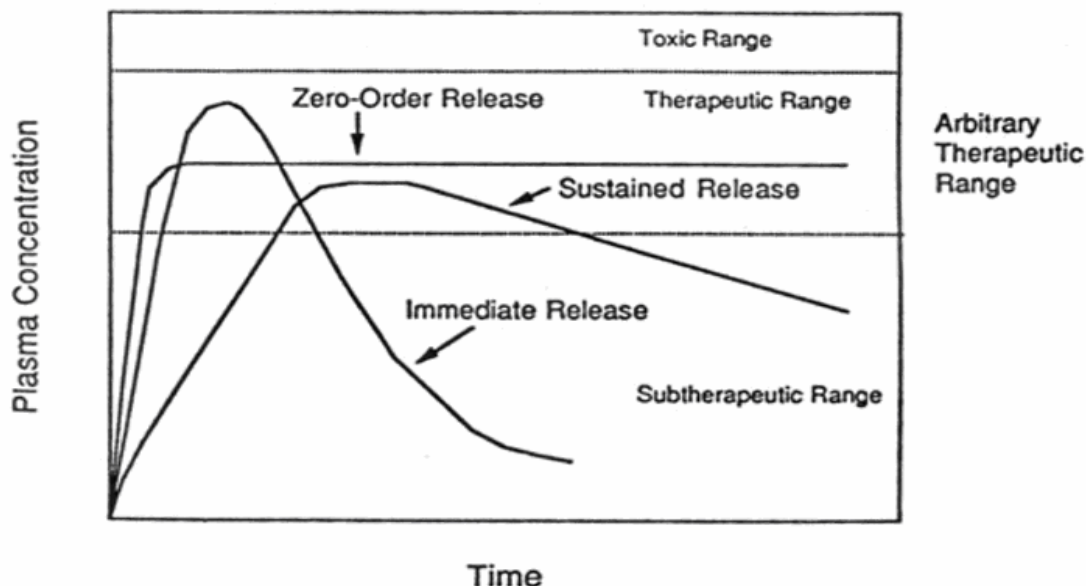


Fig.3.3.1 Profilo della concentrazione di farmaco nel sangue rispetto al tempo da un sistema a rilascio controllato, sostenuto e da una capsula convenzionale.

I sistemi che permettono il rilascio controllato di agenti terapeutici da diverse matrici stanno diventando sempre di più oggetto di studio e d'interesse commerciale, dato i vantaggi che producono in termini di sicurezza, efficacia e convenienza. Un numero di diversi sistemi a matrice polimerica sono stati studiati come sistemi per il rilascio di farmaci e alcuni di essi sono anche disponibili in commercio [149,150]. In molte applicazioni biomediche, come riportato estensivamente in letteratura, sono stati utilizzati anche i materiali ceramici; per esempio alcuni ormoni possono essere adsorbiti sulla superficie di HA e rilasciati "in situ", dopo l'impianto, al fine di accelerare il processo di rigenerazione dell'osso [151].

3.4 Modelli dei sistemi a rilascio di farmaci

I sistemi a rilascio controllato di farmaci possono essere di diverso tipo a seconda del meccanismo che regola il rilascio del farmaco:

1. Sistemi controllati dalla dissoluzione
2. Sistemi controllati dalla diffusione
3. Sistemi controllati chimicamente
4. Sistemi attivati dal solvente

Per semplificare la trattazione studieremo solo dei sistemi controllati dalla diffusione, dato che i sistemi da noi preparati rientrano in tali.

3.4.1 Sistemi a Diffusione

La diffusione è un processo di trasferimento di massa di molecole di soluto determinato dalla presenza di un gradiente di concentrazione.

La diffusione può aver luogo essenzialmente secondo due meccanismi:

1. solubilizzazione e diffusione del diffondente nel polimero nel caso di polimeri non porosi;
2. diffusione nel liquido che bagna la rete di pori nel caso di supporti porosi.

L'uno o l'altro meccanismo è predominante a seconda della morfologia del sistema, delle caratteristiche del polimero e della natura del principio attivo.

Il trasporto di un permeante attraverso una membrana polimerica è descritto dalla 1^a Legge di Fick che definisce l'equazione costitutiva del trasporto di massa

$$J = - D \frac{dC}{dX}$$

È conseguenza dell'abilità del farmaco di diffondere in un solvente e dipende dal peso molecolare e dalla carica del farmaco. Il flusso J di una particella in fase libera è direttamente proporzionale al gradiente di concentrazione (dC/dX) a meno di una costante D , ed ha verso opposto ad esso. Quindi se il gradiente di concentrazione aumenta in un verso il flusso aumenta nell'altro. Il coefficiente di diffusione D tiene conto dell'energia cinetica posseduta dalle molecole e dell'attrito che esse incontrano, dato che esistono delle interazioni tra le molecole di solvente e quelle di soluto.

Il coefficiente di diffusione è direttamente proporzionale alla temperatura assoluta (più alta è la temperatura maggiore è l'energia cinetica) ed inversamente proporzionale al raggio della particella (più una particella è grande, minore è la sua

velocità) ed alla viscosità del mezzo (se un solvente è molto viscoso, aumentano le interazioni soluto-solvente).

In un film polimerico omogeneo le molecole di penetrante si solubilizzano e diffondono grazie ad un moto causale attraverso le catene polimeriche ciò è possibile perché le catene polimeriche sono dotate di una elevata mobilità che consente la diffusione del soluto. In un polimero gommoso o in un gel, cioè in un polimero caratterizzato da segmenti che ruotano liberamente, il coefficiente di diffusione è elevato, in un polimero vetroso e rigido la scarsa mobilità delle catene rende il polimero meno permeabile. Infine, in un polimero semicristallino i cristalli stessi costituiscono degli elementi di giunzione fisica che legano le catene, provocando un'ostruzione sterica del dominio cristallino alla diffusione del soluto.

I sistemi a diffusione sono caratterizzati da una velocità di rilascio del farmaco che dipende dalla sua diffusione attraverso una barriera inerte di membrana.

Di solito questa barriera è un polimero insolubile. In generale due tipi di sottoclassi di sistemi di diffusione sono a disposizione: dispositivi a riserva e dispositivi a matrice.

3.4.1.(a) Dispositivi a riserva

Essi sono caratterizzati da un core di farmaco, la riserva, circondato da una membrana polimerica. Le caratteristiche principali di un dispositivo a riserva sono state riassunte nella tabella IV. La natura della membrana determina la velocità di rilascio del farmaco dal sistema Fig.3.4.1.1

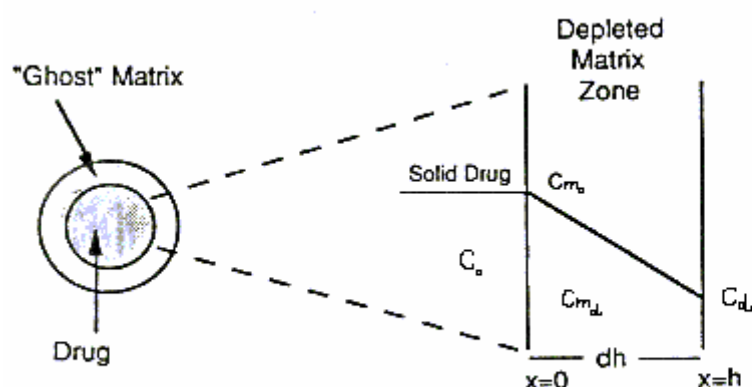


Fig.3.4.1.1 Rappresentazione schematica di un sistema a riserva. $C_{m(0)}$ e $C_{m(d)}$ rappresentano le concentrazioni di farmaco all'interno della superficie della membrana, C_0 e C_d rappresentano le concentrazioni nella regione adiacente.

Descrizione	Un “core” di farmaco circondato da una membrana polimerica che controlla la velocità di rilascio.
Vantaggi	E' possibile il rilascio con una cinetica ordine-zero. La velocità di rilascio varia con il tipo di polimero.
Svantaggi	E' difficile il rilascio di composti ad alto peso molecolare. C'è una potenziale tossicità se il sistema fallisce.

Tabella IV Caratteristiche di Sistemi a diffusione a riserva

3.4.1.(b) Dispositivi a matrice

In essi il farmaco è disperso omogeneamente attraverso una matrice polimerica come rappresentato in Fig.3.4.1.2

Nel modello, il farmaco sullo strato superficiale esposto alla soluzione, in cui è immerso il sistema, è dissolto per primo, e poi diffonde man mano fuori dalla matrice. Questo processo continua all'interfaccia tra la soluzione, in cui il sistema è immerso, e il farmaco solido che si muove dall'interno.

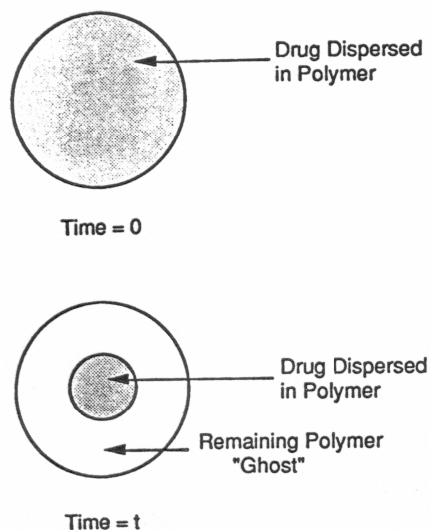


Fig. 3.4.1.2 Sistema a diffusione a matrice prima del rilascio di farmaco (time=0) e dopo il rilascio parziale di farmaco (time=t).

Affinché il sistema sia controllato dalla diffusione, la velocità di dissoluzione delle particelle di farmaco nella matrice deve essere maggiore della velocità di diffusione del farmaco nella matrice. Contrariamente ai sistemi a riserva, il gradiente di

concentrazione all'interfaccia polimero mezzo di rilascio non è costante e varia in funzione del tempo. Derivazioni del modello matematico per descrivere questo sistema implica le seguenti assunzioni:

1. un pseudo stato di equilibrio è mantenuto durante il rilascio del farmaco;
2. la soluzione in cui il sistema è immerso deve provvedere a condizioni di immersioni e contatto per tutto il tempo;
3. il coefficiente di diffusione del farmaco nella matrice resta costante.

Le equazioni che descrivono la velocità di rilascio di farmaco disperso in un sistema a una matrice inerte sono descritte da Higuchi; combinando queste equazione con quelle relative alla teoria della diffusione, otteniamo la seguente equazione che ci descrive il rilascio da un sistema a matrice porosa o granulare:

$$M = [D_s C_a p / T (2C_0 - pC_a) t]^{1/2}$$

Dove M=concentrazione di farmaco rilasciato; P=porosità della matrice; T=tortuosità; C_a=solubilità del farmaco nel mezzo di rilascio; D_s=coefficiente di diffusione nel mezzo di rilascio.

Se ci troviamo in questo caso quindi, sarà possibile controllare il rilascio di farmaco da un sistema a matrice omogeneo, variando i seguenti parametri: (a) Concentrazione iniziale del farmaco nella matrice, C₀; (b) Porosità della matrice, p; (c) Tortuosità, T; (d) Sistema polimerico formante la matrice e (e) Solubilità del farmaco. I sistemi a matrice offrono diversi vantaggi. Essi sono di facile preparazione e possono rilasciare anche composti ad alto peso molecolare. Dato che il farmaco è disperso omogeneamente nella matrice, una dispersione accidentale si verifica più raramente, sebbene, occasionalmente, la rottura della matrice può causare rilascio indesiderato. Le caratteristiche di questo sistema sono schematizzate in tabella V.

Descrizione	Dispersione omogenea di farmaco allo stato solido in una miscela polimerica.
Vantaggi	Sistemi facili da produrre e in grado di rilasciare macromolecole.
Svantaggi	<ul style="list-style-type: none"> • Il rilascio non è di ordine zero. • Rimuovere la matrice restante.

Tabella V

3.5 Polimeri utilizzati per l'applicazione dei sistemi a rilascio controllato

I polimeri utilizzati nella tecnologia dei sistemi a rilascio controllato di farmaci possono essere biodegradabili e non. La scelta del polimero è dettata dallo specifico bisogno per quella determinata applicazione. Nel caso in cui il sistema sia destinato a uso esterno o una somministrazione orale si è meno oculati nella scelta di quando invece l'applicazione riguarda usi più delicati quali intravenosi o subcutanei o per applicazioni in cavità delicate e non facilmente accessibili come le vie respiratorie. Per uso esterno il polimero utilizzato può essere non biodegradabile, mentre nel secondo gruppo di applicazioni è molto importante utilizzarne uno biodegradabile, vedere tabella VI. Durante il periodo di studio relativo alla tesi in oggetto sono stati preparati modelli di sistemi a rilascio controllato di farmaci utilizzando come polimero il policaprolattone.

NON BIODERADABILI	BIODERADABILI
Polisilossani	Polilattidi
Poliacrilati	Poliglicolidi
Poliuretani	Policianoacrilati
Polietileni	Poliortoesteri
	Polianidridi
	Polisaccaridi
	Policarbonati
	Policaprolattoni

Tabella VI

3.6 Farmaci candidati per un SRC

Il rilascio controllato dipende sia dalle caratteristiche del principio attivo che del biomateriale e dalle interazioni esistenti tra loro; la solubilità del farmaco, per esempio, è uno dei punti chiave, infatti in caso di farmaci scarsamente solubili la bassa velocità di dissoluzione diventa il fattore limitante al rilascio [152]. I sistemi a rilascio controllato si basano sull'impiego di polimeri di diversa natura chimica, le proprietà chimico-fisiche e le modalità di impiego possono permettere la

realizzazione della cinetica di cessione del farmaco desiderata, ottimizzandone il profilo di attività. I requisiti fondamentali di un biomateriale da impiegare in una SRC sono:

- compatibilità tra le caratteristiche chimico-fisiche della matrice e la farmacocinetica del principio attivo;
- resistenza meccanica tale da consentire la somministrazione e il mantenimento dell'integrità del sistema di rilascio;
- biocompatibilità, ovvero scarsa tossicità cellulare e tissutale.

I farmaci candidati ideali per un sistema a rilascio controllato di farmaco sono quelli con un profilo farmacocinetico svantaggioso, quelli con breve emivita (limitato dalle elevate quantità di farmaco da somministrare), per farmaci scarsamente assorbibili per i quali per vie di somministrazione tradizionale si fa ricorso alla via parenterale.

3.6.1 Farmaci utilizzati per il nostro SRC

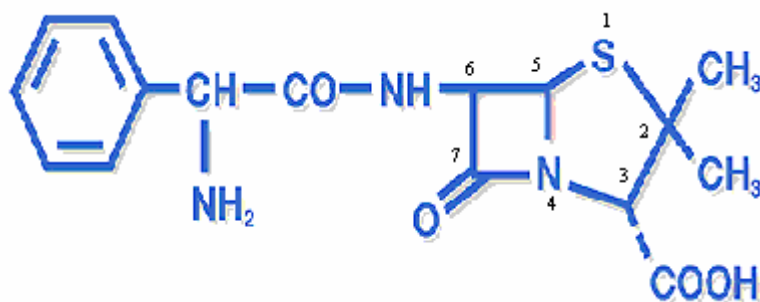
Un'infezione delle strutture di sostegno dei denti è la periodontite, causata dall'infezione dei batteri anaerobi Gram negativi. Rispetto alla gengivite, la periodontite comporta un'infezione più profonda, in quanto colpisce la radice del dente. Provoca l'indebolimento dell'apparato dentale ed a volte anche la perdita ossea della mascella. Se non trattata, la periodontite può essere causa di mal di denti, caduta dei denti e malattie interne indotte dai germi che, attraverso il sangue, passano dalla bocca ad altri organi. Nel caso in cui si procede all'impianto di una protesi dentaria è necessario anche eliminare i batteri patogeni presenti sulla parte interessata. L'uso effettivo di agenti antibatterici per il trattamento della periodontite richiede una adeguata concentrazione dell'antibiotico sul sito interessato, nonché tale concentrazione deve rimanere costante nell'arco di tempo necessario affinché gli agenti agiscano. A tale scopo nel presente studio si focalizza l'attenzione sugli antibiotici e sui sistemi per l'incorporazione e rilascio degli stessi da biovetri, già utilizzati per protesi dentarie, sintetizzati con la tecnica sol-gel. Ciò permetterà la somministrazione *controllata* e *mirata* degli agenti terapeutici per il trattamento contro le infezioni da periodontite. Gli antibiotici sono sostanze prodotte da varie specie di microrganismi (batteri, funghi e actinomiceti) che sopprimono la crescita di altri microrganismi e ne possono causare la distruzione. Tuttavia nell'uso comune il termine antibiotico include anche farmaci antibatterici di origine sintetica. In base al loro meccanismo di azione vengono classificati in:

- 1) antibiotici interferenti con le funzioni della membrana citoplasmatica;
- 2) inibitori della sintesi proteica;
- 3) inibitori della biosintesi della parete batterica.

Tra gli antibiotici appartenenti al terzo gruppo, il più importante e più numeroso è il sottogruppo dei β -lattamici che comprende l'importante categoria delle penicilline la cui struttura base riportata nella figura sottostante è la PENAM (*PEN* sta per penicillina, *AM* sta per struttura satura).



La struttura PENAM è data dalla condensazione dell'anello β -lattamico con quello tiazolidinico. L'anello β -lattamico, indispensabile per l'attività dell'antibiotico, è un'ammide ciclica a quattro termini notevolmente tensionato con due atomi di C (α e β) ibridi sp^3 posti in angoli di legame di 90° anziché di 109.5° , per questo motivo il legame carbossamidico è reso debole. Questo legame in realtà non è altro che un legame peptidico, in quanto gli antibiotici β -lattamici biogeneticamente derivano da amminoacidi prodotti da microrganismi. L'importanza del nucleo β -lattamico sta nella sua instabilità ed è proprio questo che spiega il meccanismo di azione: il C carbonilico è δ^+ e nell'anello è più accentuato a causa dell'N e dell'O che sono due elettrone-attrattori. Il $C\delta^+$ subisce facilmente l'attacco nucleofilo del doppietto elettronico dell'O della serina (Ser), posta nel sito recettoriale dell'enzima transpeptidasi. La transpeptidasi è l'enzima che interviene nell'ultima tappa della sintesi del peptidoglicano che è un costituente essenziale della parete dei batteri Gram positivi e Gram negativi, in questo modo l'enzima rimane irreversibilmente bloccato impedendo l'organizzazione della parete batterica con il risultato della morte del batterio. Nel presente lavoro l'antibiotico preso in considerazione è l'ampicillina, la cui struttura è la seguente:



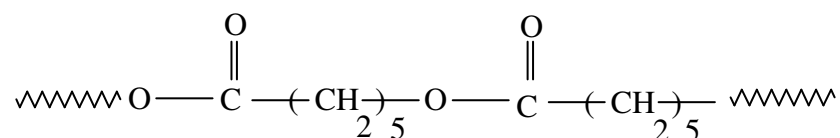
Possiamo osservare la struttura base PENAM con i relativi sostituenti, in posizione 2 abbiamo un C non chirale legato a due metili che è una caratteristica strutturale fissa di questa classe, anche se non sembrano prendere parte al meccanismo di azione. Il C in posizione 3 ha una funzione carbossilica, un gruppo indispensabile per il primo legame al sito recettoriale della transpeptidasi ed è un C chirale. La posizione 6 va messa in evidenza perché si trova la catena laterale di tipo carbossi-amidico che è la parte variabile nei diversi tipi di penicilline, infatti in base alla sua natura si modulano le proprietà farmacocinetiche e farmacodinamiche. La struttura non è planare, ma i due anelli quello β -lattamico e tiazolidinico formano un angolo ottuso di 110° rendendo l'anello ancora più instabile e ne potrebbe comportare l'apertura in ambiente acido prima di raggiungere il sito recettoriale della transpeptidasi. L'ampicillina, grazie alla catena laterale in posizione 6 che ricopre l'anello β -lattamico, quindi la zona farmacoforica, ne aumenta la stabilità in ambiente acido permettendone l'utilizzo in terapia anche per via orale, ma la dose somministrata viene assorbita per il 30-40%, il suo intervallo di dosaggio è di ogni 6h ed ha una emivita di 1h. L'ampicillina si ritrova nella bile, subisce il ricircolo enteroepatico ed è escreta in quantità apprezzabili nelle feci. La dose terapeutica di ampicillina varia in funzione del tipo e della gravità dell'infezione che si deve curare, dell'età del paziente e delle condizioni renali (una disfunzione renale aumenta l'emivita). Nel caso di infezioni gravi, come quella della periodontite, si consiglia la somministrazione per via parenterale. Somministrazioni parenterali ripetute causano disagio al paziente che può essere superato con gli SRC dove uno degli obiettivi è quello di aumentare la compliance del paziente. L'obiettivo del presente lavoro di tesi è stato l'incorporazione di ampicillina in materiali ibridi sintetizzati con la tecnica sol-gel e il cui rilascio deve essere immediato o prolungato secondo l'utilizzo del sistema, controllato e mirato sulla parte infettata, evitando quindi, il diffondersi di infiammazione nel tessuto circostante.

CAPITOLO IV

RISULTATI SPERIMENTALI

4.1 Sol-gel di ibridi organo-inorganici

È noto che i materiali a base di zirconio e di titanio, risultano essere bioattivi [139]. La condizione essenziale [153] affinché i materiali si possano legare alle ossa è la formazione di uno strato di apatite che costituisce una componente dell'osso stesso. Lo scopo del presente lavoro è stato la sintesi via sol-gel di ZrO_2 -5wt% Y_2O_3 e TiO_2 all'interno del quale è stato inglobato un polimero biodegradabile, il poli-ε-caprolattone, avente la seguente formula:



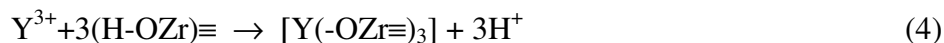
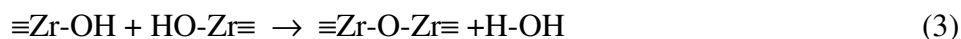
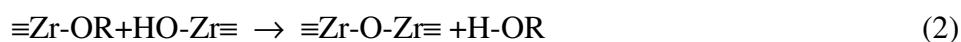
Sono stati ottenuti ibridi organo-inorganici da utilizzare nel campo biomedico, è stato, inoltre, in tali materiali incorporato l'antibiotico (ampicillina) e studiata la cinetica di rilascio. I materiali sintetizzati con il metodo sol-gel sono di composizione:

- ZrO_2 -5wt% Y_2O_3 +AMP(0 e 5wt%)
- ZrO_2 -5wt% Y_2O_3 +PCL (6, 12 e 24wt%)+AMP(0 e 5wt%)
- TiO_2 +Amp(0 e 5wt%)
- TiO_2 +PCL (6, 12 e 24wt%)+Amp(0 e 5wt%).

4.1.1 Sintesi sol-gel degli ibridi

I materiali di composizione ZrO_2 -5wt% Y_2O_3 +AMP(0 e 5wt%), ZrO_2 -5wt% Y_2O_3 +PCL(6, 12 e 24wt%)+AMP(0 e 5wt%), sono stati sintetizzati utilizzando zirconio propossido $\text{Zr}[\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3]_4$ quale precursore di ZrO_2 , alcool etilico come solvente, acetil acetone come agente complessante e l'acqua per consentire la reazione di idrolisi.

La gelazione è il risultato delle reazioni di idrolisi e condensazione in accordo con le seguenti equazioni:



A temperatura ambiente la reazione di idrolisi è più veloce delle reazioni di condensazione, per poter diminuire tale velocità è stato utilizzato l'acetilacetone (acacH) come agente complessante.

Per i materiali a base di TiO_2 , vale a dire $\text{TiO}_2 + \text{PCL}(0, 6, 12 \text{ e } 24\text{wt}\%) + \text{Amp}(0 \text{ e } 5\text{wt}\%)$ è stato utilizzato titanio butossido $\text{Ti}[\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3]_4$ (TBT), come precursore del TiO_2 , in una soluzione etanolo-acido acetico 100%. L'acqua, diluita con etanolo è aggiunta sotto vigorosa agitazione. Per i materiali ibridi, avendo a disposizione il polimero in pellets si è provveduto a scioglierlo a caldo, a temperatura pari a 40°C , in cloroformio. Il cloroformio è un solvente con un punto d'ebollizione pari a 61.2°C , proprio per il basso valore della temperatura di ebollizione esso è risultato il più adatto per lo scioglimento del poli- ϵ -caprolattone.

La Fig.4.1.1.1 mostra lo schema di sintesi dell'ibrido ZrO_2 -5wt% $\text{Y}_2\text{O}_3 + \text{PCL}24\% + \text{AMP}5\%$, in cui sono specificati i rapporti tra i reattivi ed il mezzo solvente. Le sintesi degli ibridi con PCL 6wt% e 12wt% sono state eseguite con lo stesso procedimento, ovviamente variando in modo opportuno il rapporto $\text{CHCl}_3/\text{Zr}[\text{O}(\text{CH}_2)_2\text{CH}_3]_4$. La Fig.4.1.1.2 mostra, invece, lo schema di sintesi del sistema $\text{TiO}_2 + \text{PCL}24\% + \text{Amp}5\%$. Per entrambi i sistemi l'ampicillina è stata aggiunta al 5% in peso in soluzione alcolica. I geli ottenuti dopo essere stati essiccati in stufa a 100°C , sono stati sottoposti a diverse indagini strumentali (FTIR, XRD, SEM, AFM). Dopo essiccazione i materiali a base di ZrO_2 si presentano sotto forma di pezzi trasparenti di grandi dimensioni, come viene mostrato in Fig.4.1.1.3, mentre per quelli a base di TiO_2 si hanno pezzi più piccoli.

Il trattamento a 100°C non modifica la stabilità della struttura chimica dell'ampicillina, ciò è stato verificato tramite analisi cromatografica HPLC. L'esperimento di cromatografia è stato fatto su un Shimadzu HPLC equipaggiato con un software Class-VP 5.0, un detector spettrofotometrico UV SPD-10AVvp e due pompe LC-10ADvp, con un sistema a basso gradiente di pressione. Le soluzioni dei campioni sono state iniettate con una siringa via a Rheodyne loop injector. Il volume del loop è stato di 20 μl . La colonna analitica è stata una Phenomenex C_{18}

(150×4.60mm; 5μ); la velocità di flusso della fase mobile A (H₂O) è stata a 0.8 ml/min e quella della fase mobile B (metanolo) è stata a 0.2 ml/min; in totale la corsa è durata 10 minuti. In Fig.4.1.1.4 sono stati riportati lo spettro dell'ampicillina (a) e gli spettri dei campioni: ZrO₂-5wt%Y₂O₃+PCL6%+Amp5wt% (b) e TiO₂+PCL6wt%+Amp5wt% (c) .

Dagli spettri cromatografici (Fig.4.1.1.4 b e c) possiamo valutare che la struttura dell'ampicillina non è stata alterata. Tali spettri però non sono sovrapponibili a quelli dell'ampicillina pura (Fig.4.1.1.4a) sia per motivi quantitativi che qualitativi, nel primo caso perché la corsa cromatografica è stata effettuata su un surnatante a pochi minuti di rilascio, quindi, poca quantità di principio attivo rispetto a quello utilizzato per lo spettro dell'ampicillina sodica pura; il secondo motivo è dovuto ad una variazione della composizione chimica che l'ampicillina subisce durante il processo di sintesi, infatti da sodica diventa acida.

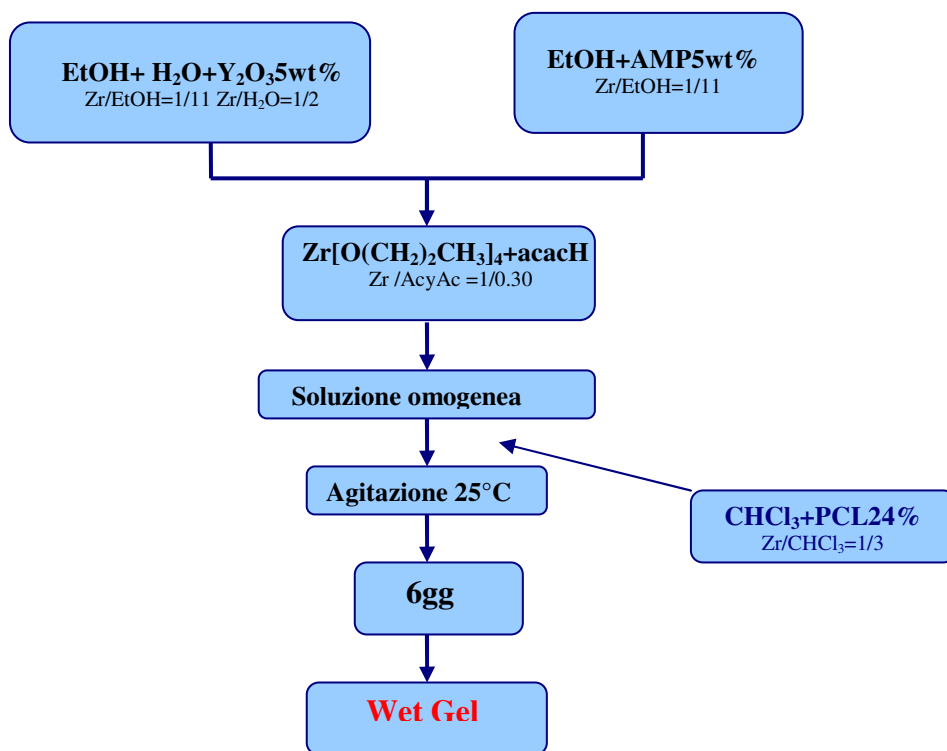


Fig.4.1.1.1 Sintesi di ZrO₂-5wt%Y₂O₃+PCL24%+AMP5%

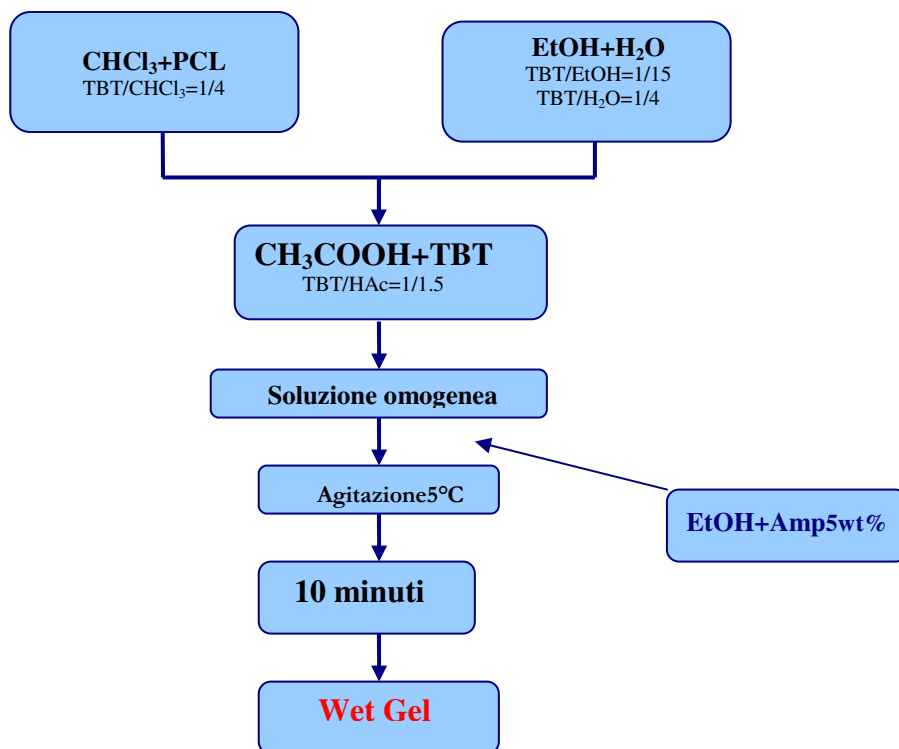
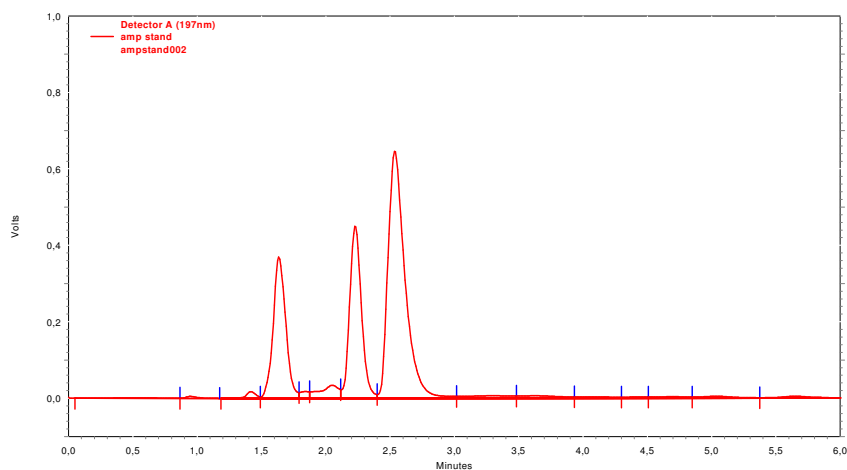


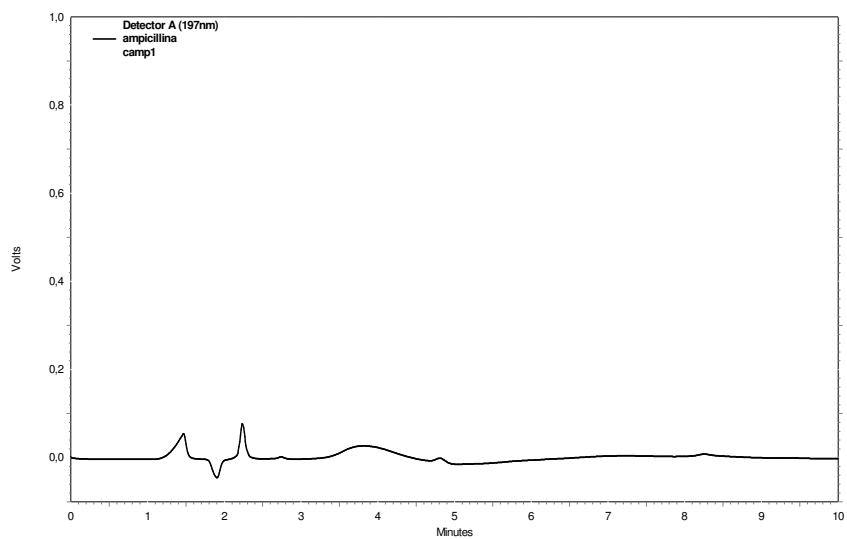
Fig.4.1.1.2 Sintesi di TiO₂+PCL24%+AMP5%



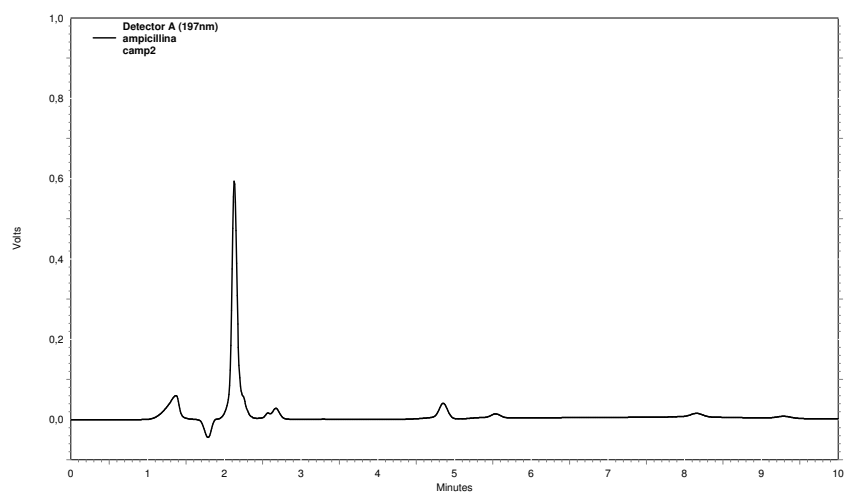
Fig.4.1.1.3 ZrO_2 -5wt% Y_2O_3 +PCL24%+AMP5% dopo essiccazione a 100°C.



(a)



(b)



(c)

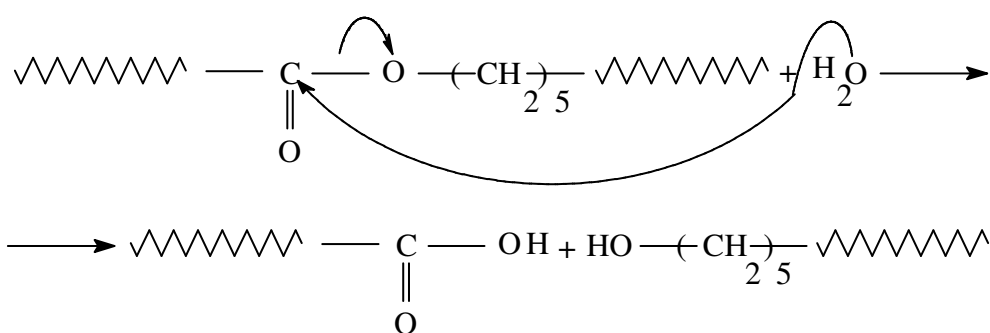
Fig.4.1.1.4 Sono riportati gli spettri cromatografici di: (a) ampicillina sodica; (b) $\text{TiO}_2 + \text{PCL6wt\%} + \text{Amp5wt\%}$; (c) $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3 + \text{PCL6wt\%} + \text{Amp5wt\%}$

4.2 Meccanismo di formazione degli ibridi

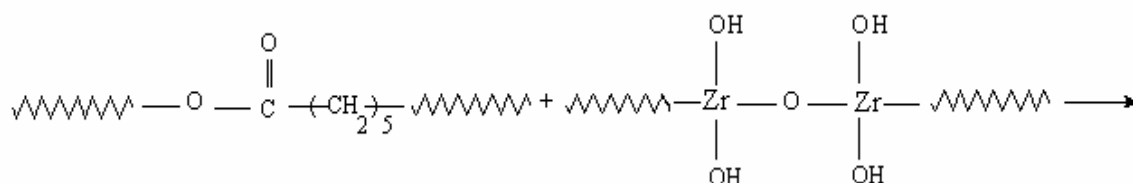
La Fig.4.2.1 mostra, lo spettro FTIR caratteristico del PCL, mentre in Fig.4.2.2 sono riportati gli spettri FTIR dei campioni (a) $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3$, (b) $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+PCL6wt\%}$, (c) $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+PCL12wt\%}$ e (d) $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+PCL24wt\%}$ rispettivamente; in Fig. 4.2.3 sono riportati gli spettri FTIR dei campioni (a) TiO_2 , (b) $\text{TiO}_2\text{+PCL6\%}$, (c) $\text{TiO}_2\text{+PCL12\%}$, (d) $\text{TiO}_2\text{+PCL24\%}$. Si può osservare in (b), (c) e (d) per entrambe gli spettri (4.2.2-4.2.3) la presenza degli assorbimenti caratteristici del PCL a 2950 e a 2853 cm^{-1} (stretching simmetrico dei gruppi $\text{—CH}_2\text{—}$), a 1190 cm^{-1} (stretching —C—O dei lattoni) che si aggiungono a quelli (Fig.4.2.2a) caratteristici di ZrO_2 posizionati, a 1027 cm^{-1} (stretching Zr=O) e a 452 cm^{-1} (stretching Zr-O-Zr). In (Fig.4.2.3a) la banda a circa 800 cm^{-1} è dovuta alle vibrazioni del poliedro TiO_n con un numero di coordinazione minore di 6. Il doppietto a circa 1500 cm^{-1} corrisponde al ligando acetato bidentato legato al titanio. L'analisi di tali spettri consente di ipotizzare il meccanismo responsabile della formazione dell'ibrido.

La chimica del processo sol-gel e il meccanismo di biodegradazione del PCL suggeriscono, infatti, che diversi potrebbero essere i meccanismi responsabili della formazione di un materiale omogeneo quale quello ottenuto.

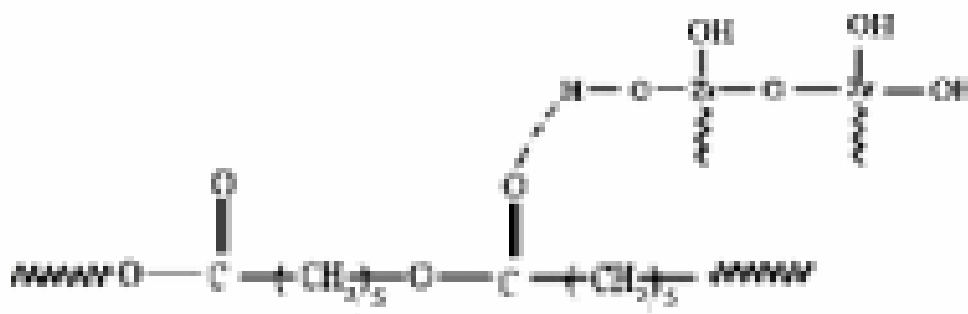
MECCANISMO 1: idrolisi del legame estereo del PCL, causata dall'acqua presente nell'ambiente di reazione, con conseguente degradazione del materiale polimerico:



MECCANISMO 2: formazione di ponti a idrogeno tra materiale polimerico e network inorganico in crescita. Il processo sol-gel genera gruppi idrossilici, alcuni dei quali rimangono sulla superficie della matrice inorganica; d'altro canto gli ossigeni carbonilici sono ben noti come agenti nucleofili, dunque predisposti alla formazione di legami a idrogeno:



NETWORK IN CRESCITA



È sicuramente da escludere il meccanismo 1, considerata l'elevata suscettibilità all'idrolisi dello zirconio propossido e anche del titanio butossido ed i lunghi tempi relativi al processo di scissione idrolitica del legame estereo del PCL [115]; tale risultato è confermato dagli spettri FTIR, che evidenziano la presenza del polimero attraverso i segnali caratteristici del PCL, una analoga reazione si ha per i materiali a base di TiO_2 .

Gli spettri FTIR dei materiali sintetizzati sembrano, invece, confermare il meccanismo 2; grazie ad esso, infatti, è possibile giustificare la presenza della banda caratteristica dello stretching dei legami $\text{Zr} \text{---} \text{O} \text{---} \text{Zr}$ e nel caso dei sistemi a base di TiO_2 lo stretching dei legami $\text{Ti} \text{---} \text{O} \text{---} \text{Ti}$ nonché la presenza di picchi nella zona $3200\text{--}3600 \text{ cm}^{-1}$ caratteristica dei gruppi $\text{O} \text{---} \text{H}$ riferiti ai legami a idrogeno.

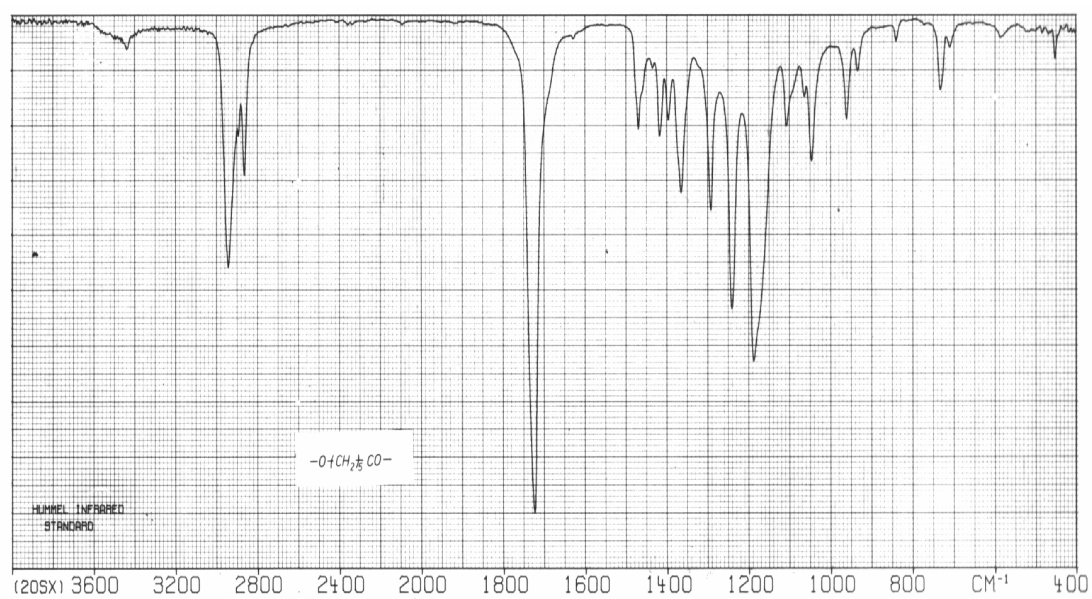


Fig. 4.2.1 Spettro del Poli-ε-caprolattone

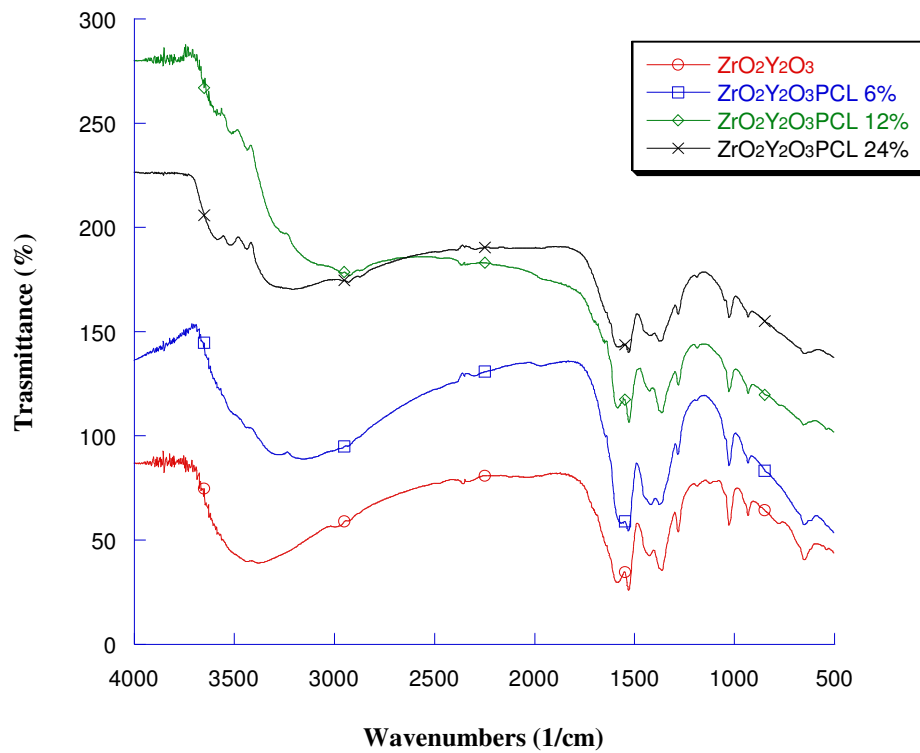


Fig. 4.2.2 Analisi FTIR dei materiali ibridi a base di $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3$

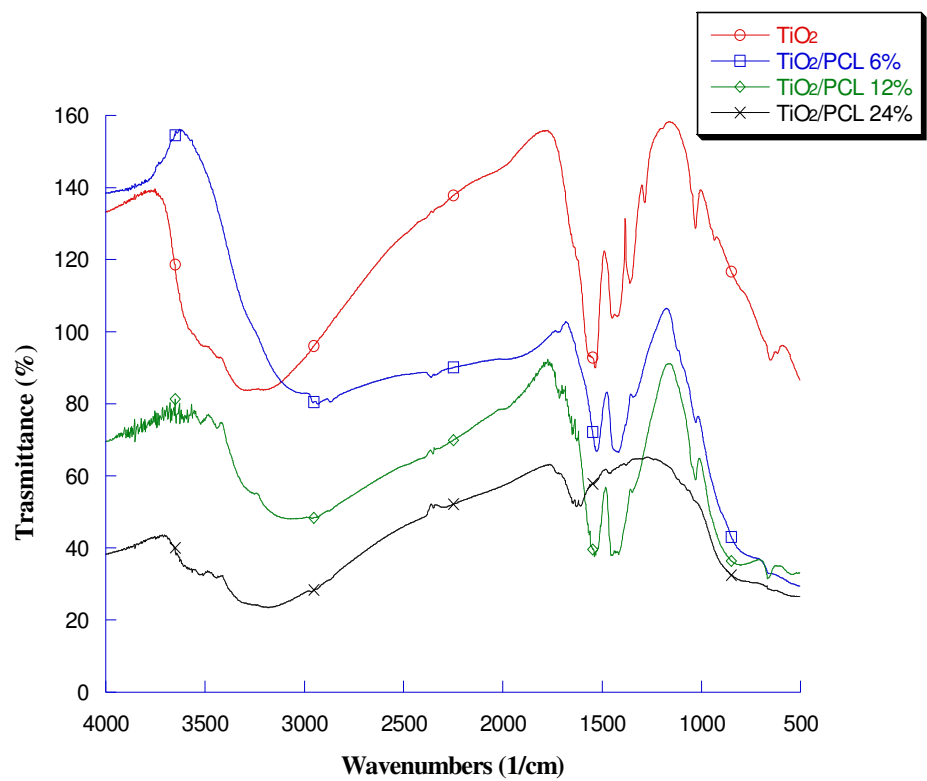


Fig. 4.2.3 Analisi FTIR dei materiali ibridi a base di TiO_2

4.3 Analisi dei diffrattogrammi XRD

Nella Fig.4.3.1 è riportato lo spettro XRD caratteristico del PCL. Per entrambi i sistemi a base di ZrO_2 -5wt% Y_2O_3 +AMP5wt% gel e TiO_2 +AMP5wt% gel si osserva la natura amorfa (Figs.4.3.2a-4.3.3a) che viene conservata nei rispettivi ibridi a diverse percentuali in peso di PCL. Le figure riportano i diffrattogrammi di ZrO_2 -5wt% Y_2O_3 PCL24%+AMP5wt% (Fig.4.3.2b) e TiO_2 +PCL24%+AMP5wt% (Fig.4.3.3b). Dal confronto di tali diffrattogrammi con quello relativo al poli- ϵ -caprolattone (Fig.4.3.1) possiamo osservare la perdita della cristallinità del polimero dovuta alla formazione di interazioni con lo zirconio o con il titanio che comportano la formazione di un nuovo materiale amorfo.

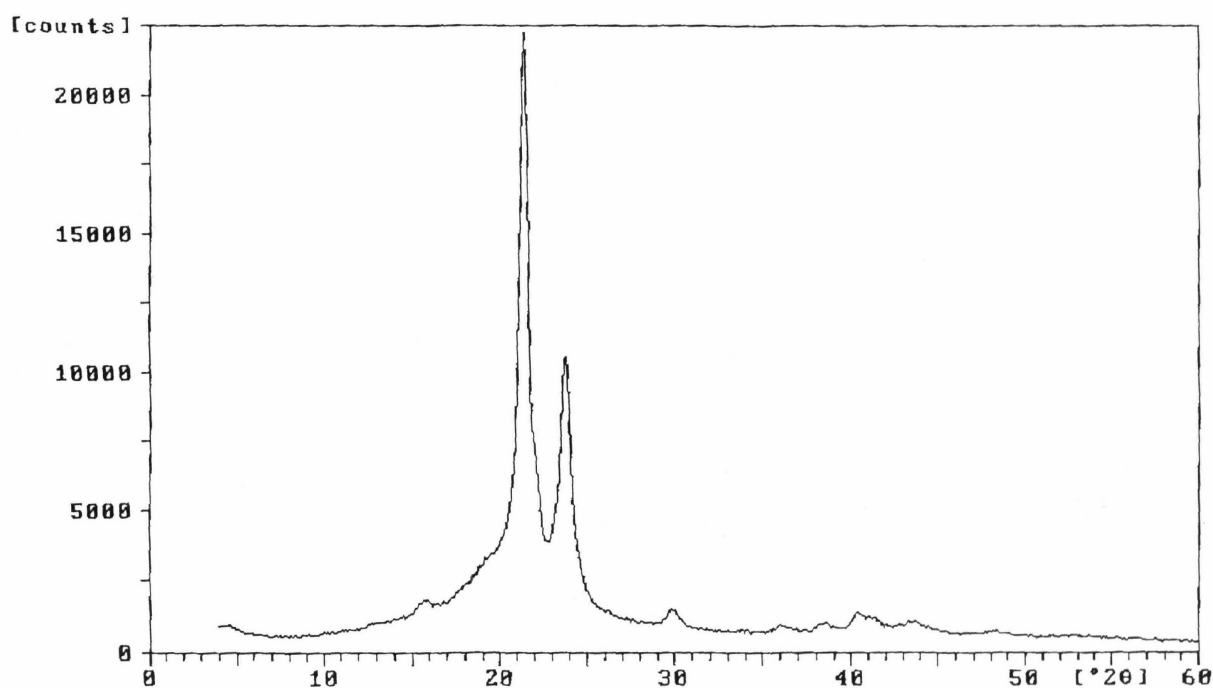
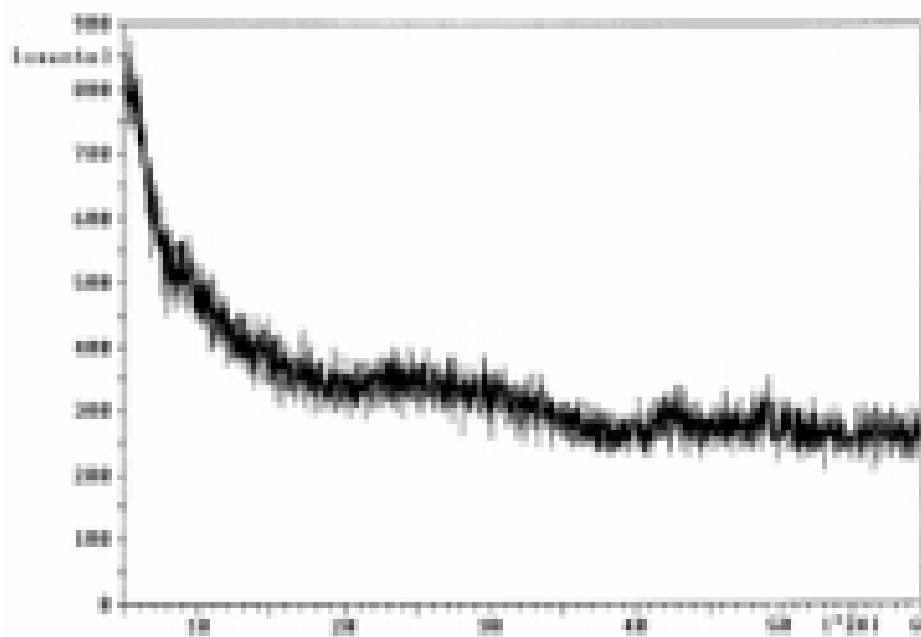
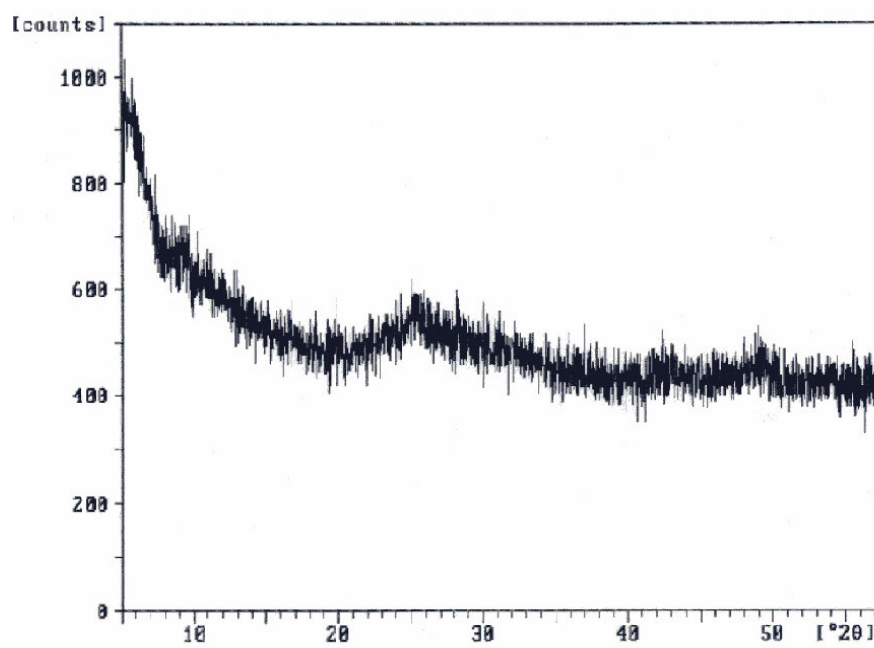


Fig. 4.3.1 Diffrattogramma XRD relativo al PCL

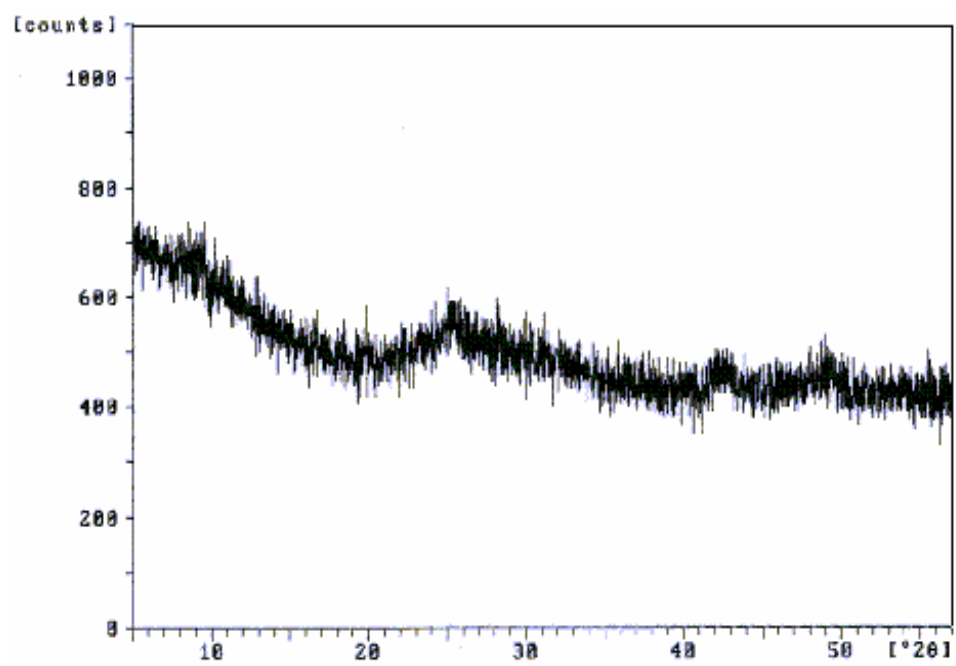


(a)

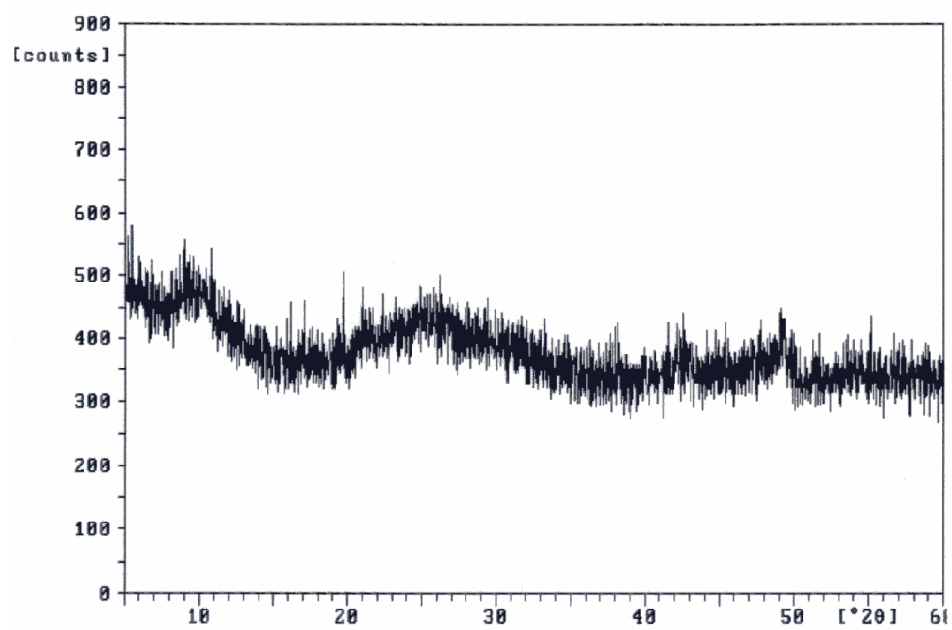


(b)

Fig.4.3.2 Diffattogramma XRD relativo a: a) $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+Amp5wt\%}$; b) $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+PCL24wt\%+AMP5\%}$



(a)



(b)

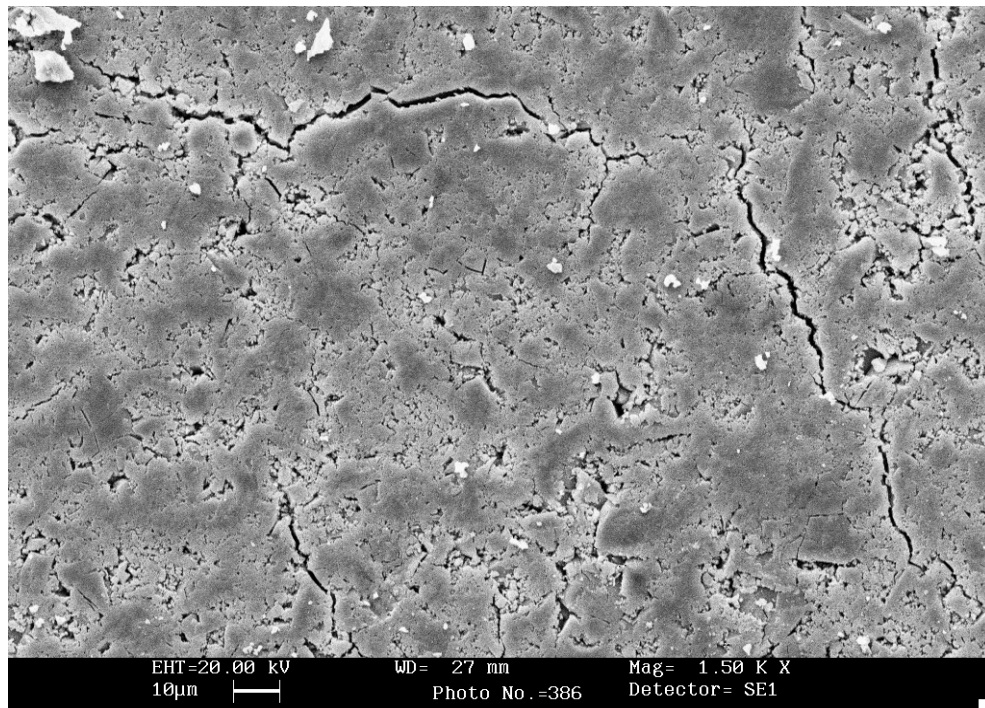
Fig.4.3.3 Diffrattogramma XRD relativo a: a) TiO_2 +AMP5%; b) TiO_2 +PCL24wt%+AMP5%

4.4 Analisi microstrutturale

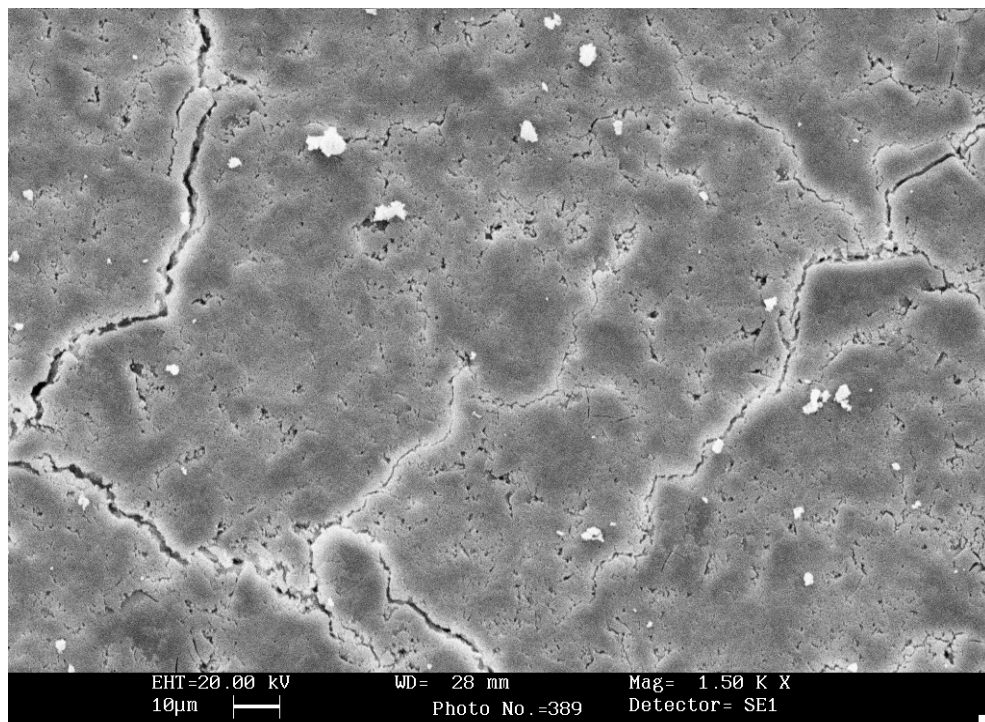
4.4.1 Microscopia elettronica a scansione (SEM)

L'analisi al microscopio elettronico a scansione (SEM) è stata eseguita sulle polveri, preventivamente compresse a 5 tons al fine di ottenere pasticche di diametro 13mm e spessore 2mm, dei diversi sistemi gelificati. Le prove sono state eseguite utilizzando il microscopio elettronico a scansione Leica S-440. I campioni, sono stati preventivamente trattati con alcol etilico e messi in un bagno ad ultrasuoni per circa due ore. Poche gocce della soluzione sono fatte asciugare su un vetrino precedentemente incollato sullo stub di alluminio; il campione viene quindi metallizzato per sputtering (bombardamento catodico) al fine di migliorare la conducibilità e quindi l'osservazione.

Le Figs.4.4.1.1(a,b) si riferiscono ai campioni $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+AMP5wt\%}$ gel e dell'ibrido $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+PCL24wt\%+AMP5wt\%}$. Le Figs.4.4.1.2(a, b) si riferiscono ai materiali $\text{TiO}_2\text{+AMP5wt\%}$ e $\text{TiO}_2\text{+PCL24wt\%+AMP5wt\%}$ rispettivamente. Dal confronto fra le immagini si evidenzia che non c'è un'apprezzabile differenza di morfologia tra i materiali amorfi presi in considerazione.

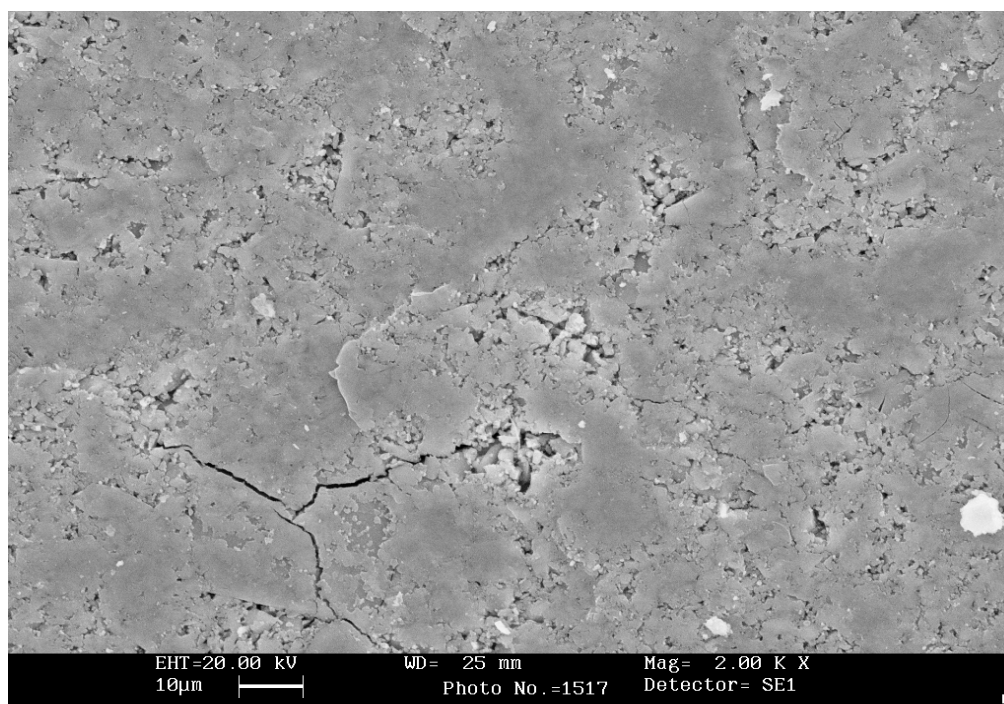


(a)

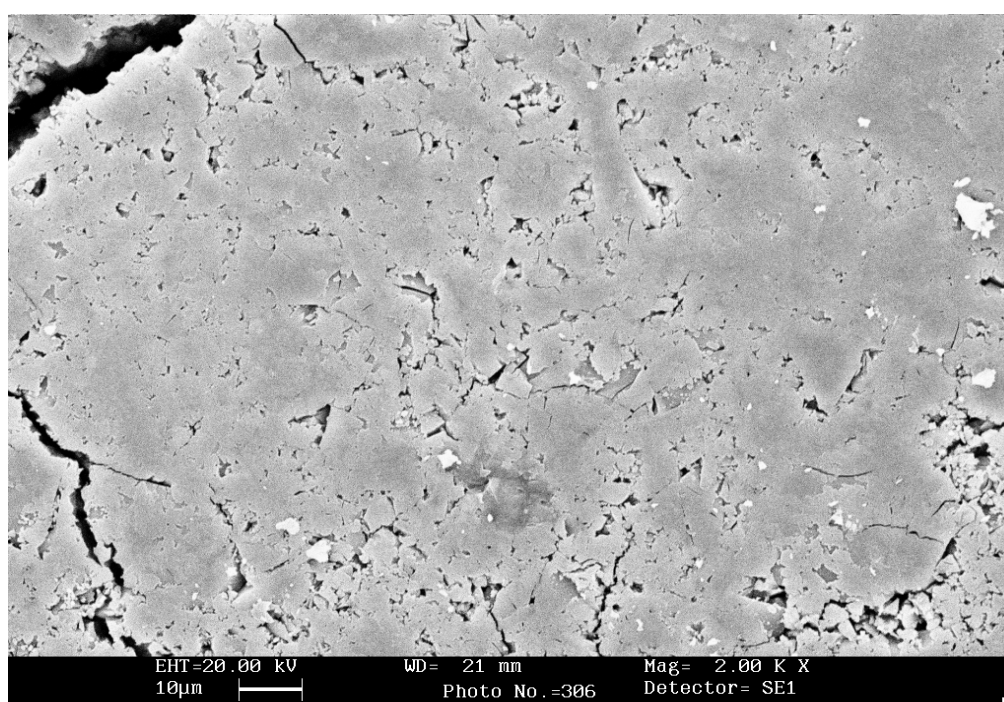


(b)

Fig. 4.4.1.1 Microfotografia SEM relativa ai materiali: a) $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+Amp5\%}$; b) $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+PCL24wt\%+AMP5\%}$



(a)



(b)

Fig. 4.4.1.2 Microfotografia SEM relativa ai materiali: a) $\text{TiO}_2 + \text{Amp} 5\%$; b) $\text{TiO}_2 + \text{PCL} 24\text{wt}\% + \text{AMP} 5\%$

4.4.2 Microscopia a forza atomica (AFM)

Le Figure da 4.4.2.1 a 4.4.2.4, mostrano le topografie AFM effettuate sulle polveri di ZrO_2 -5wt% Y_2O_3 +AMP5wt% e degli ibridi ZrO_2 -5wt% Y_2O_3 +PCL(6, 12 e 24wt%) +AMP5wt%. Le topografie AFM dei materiali a base di TiO_2 sono riportate nelle figure da 4.4.2.5 a 4.4.2.8. Le prove sono state eseguite utilizzando un microscopio universale MultiMode della Digital Instruments, con limite massimo di scansione pari a 200 μm , utilizzando la tecnica tapping-mode in aria. Il gel ZrO_2 -5wt% Y_2O_3 +AMP5wt% si presenta all'AFM, Fig.4.4.2.1, mediante un'immagine caratterizzata da domini che distano tra di loro di circa 21nm, con l'aggiunta del polimero le distanze tra le particelle diminuiscono lievemente mantenendo un valore di circa 19nm come si può osservare nelle Figs.4.4.2.2-4.4.2.4. Anche nel caso del TiO_2 +AMP5wt% la distanza tra i domini è di circa 123nm per poi diminuire a circa 14nm per l'ibrido TiO_2 +PCL24wt%+AMP5wt%. Questa minima distanza tra le particelle ci permette di identificare i materiali sintetizzati come materiali ibridi [112], tale risultato è particolarmente importante per i test biologici poichè una superficie più rugosa permette una migliore deposizione di idrossiapatite. Questi risultati confermano quanto già ricavato dalle altre indagini strumentali: i materiali sintetizzati sono ibridi organo-inorganici.

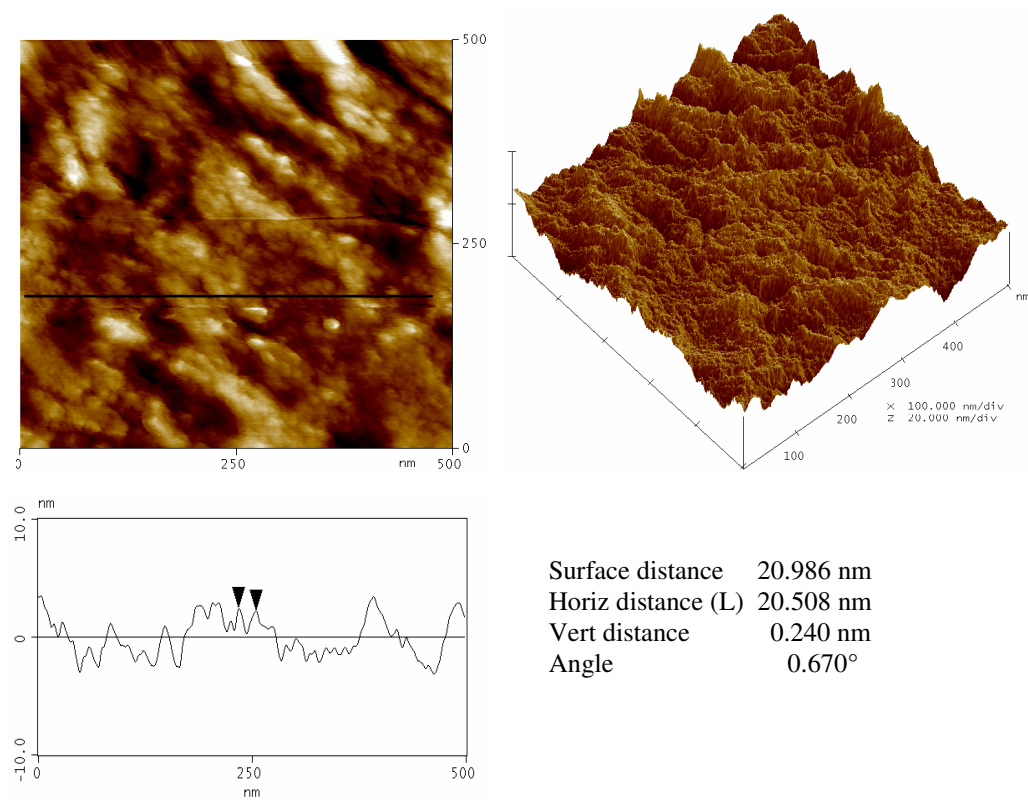


Fig. 4.4.2.1 AFM del gel $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+AMP5wt\%}$

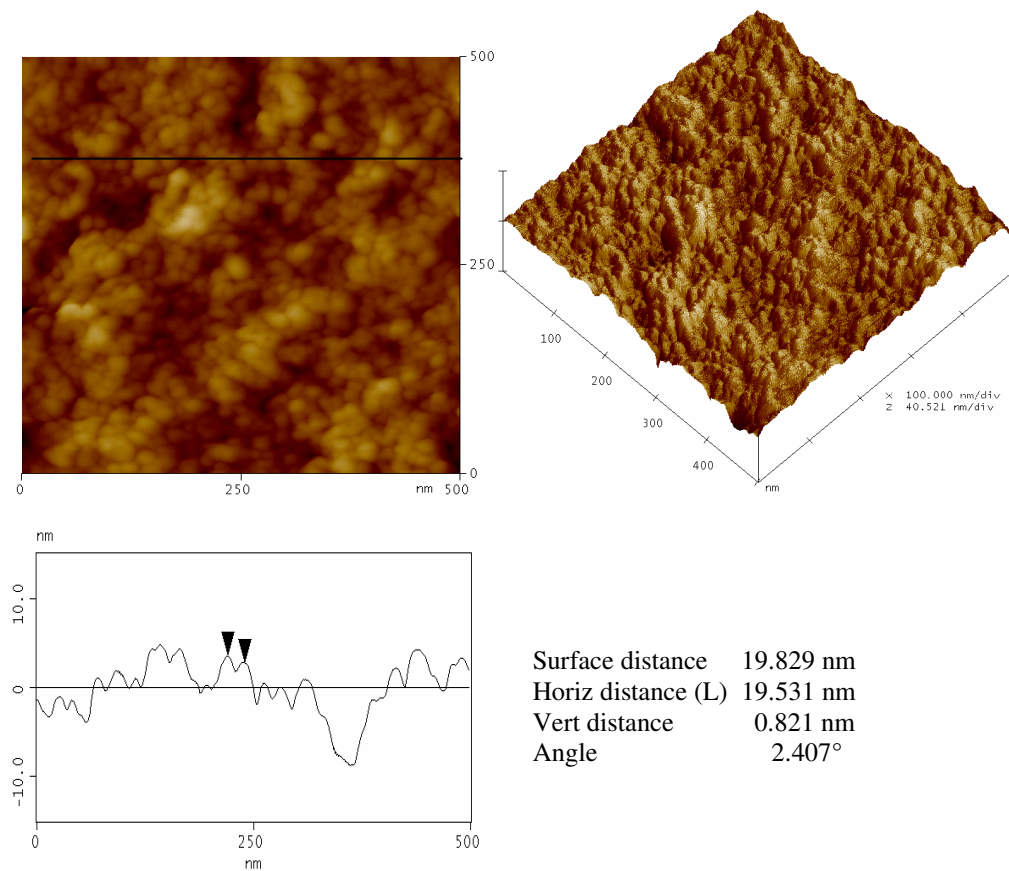


Fig. 4.4.2.2 AFM dell'ibrido $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+PCL6wt\%+AMP5wt\%}$

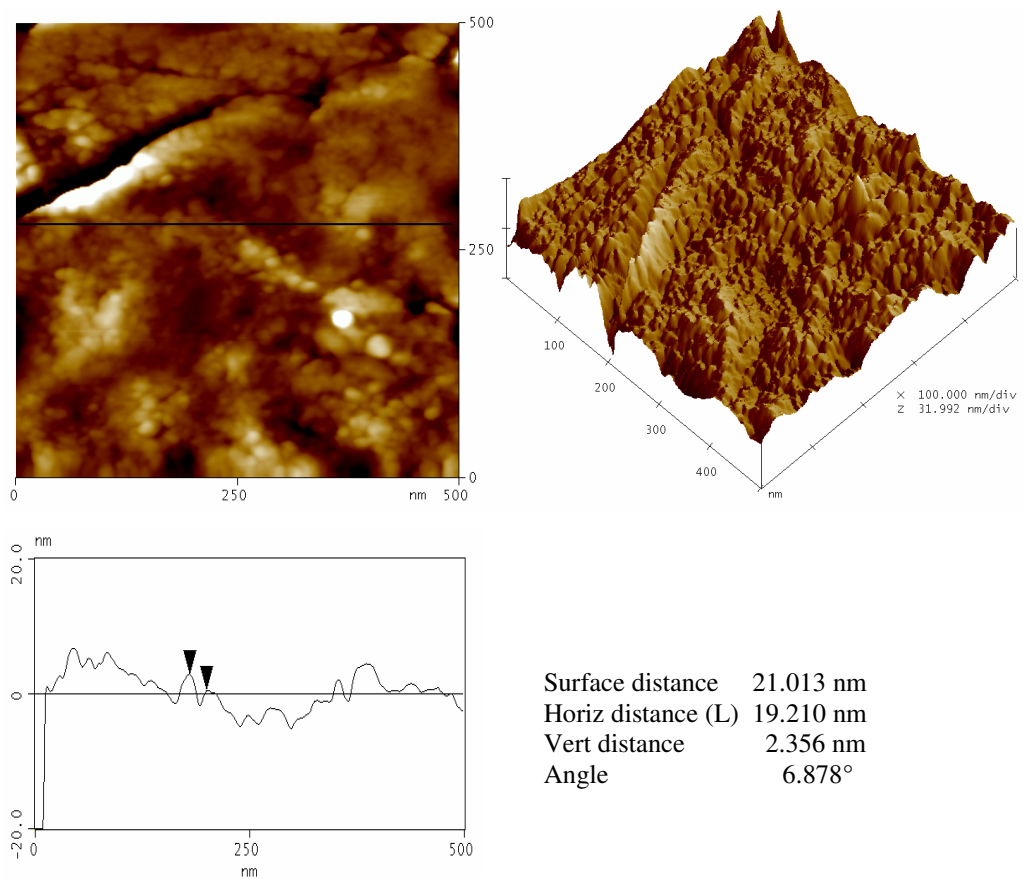


Fig. 4.4.2.3 AFM dell'ibrido $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+PCL12wt\%+AMP5wt\%}$

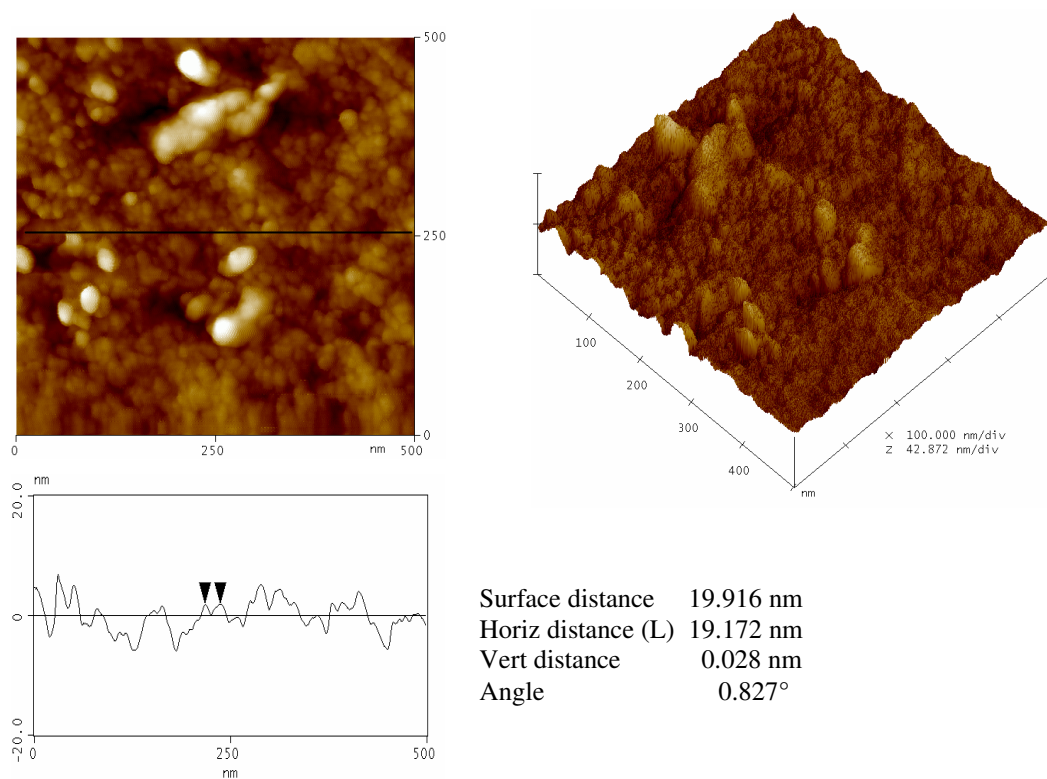


Fig. 4.4.2.4 AFM dell'ibrido $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+PCL24wt\%+AMP5wt\%}$

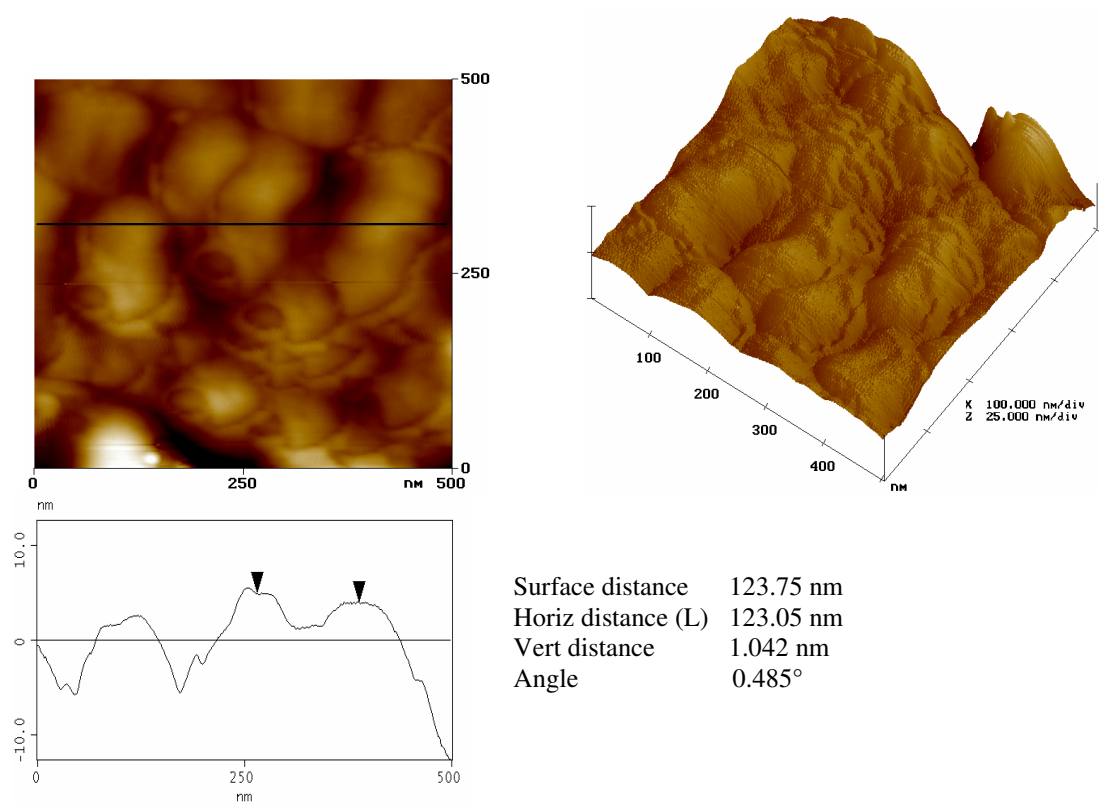


Fig. 4.4.2.5 AFM di TiO_2 +AMP5wt%

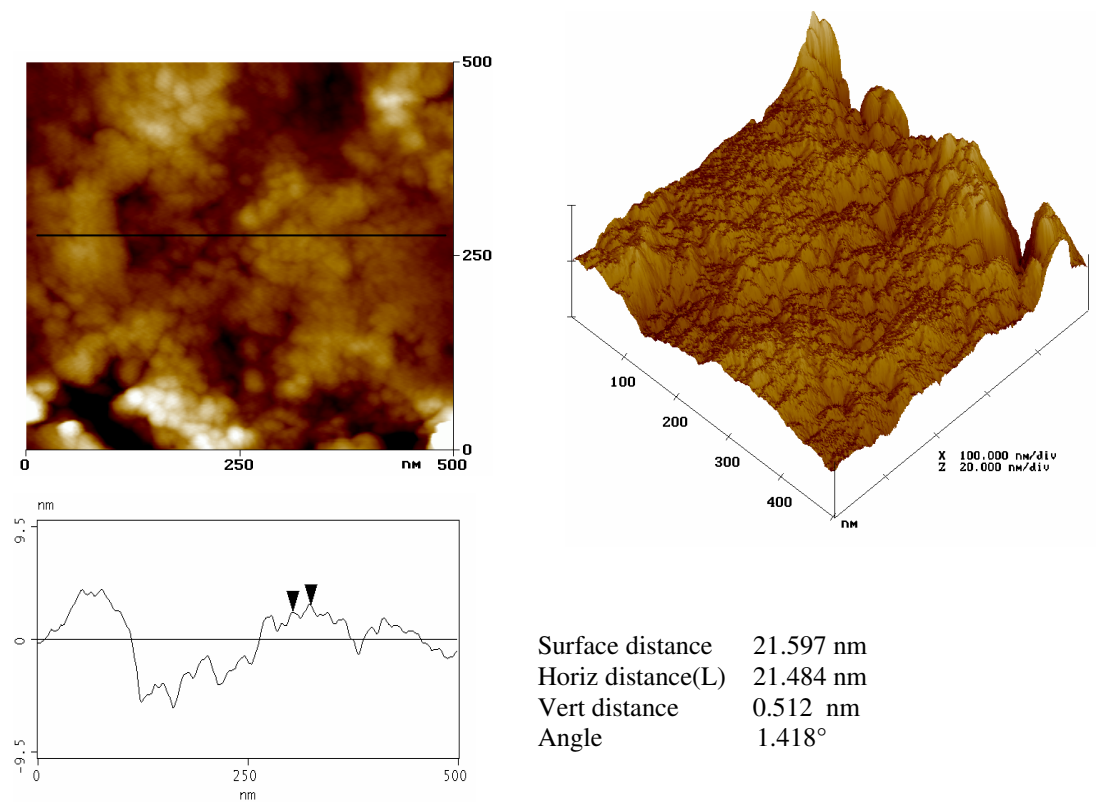


Fig. 4.4.2.6 AFM dell'ibrido TiO_2 +PCL6wt%+AMP5wt%

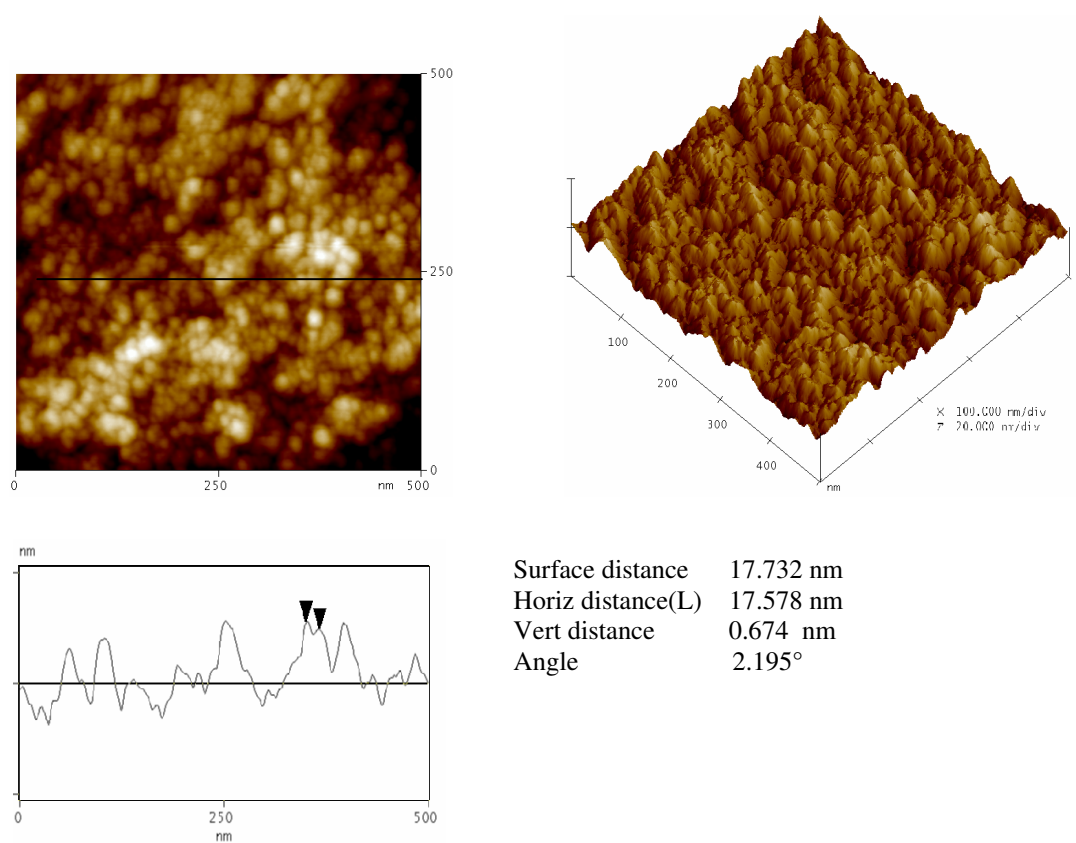


Fig. 4.4.2.7 AFM dell'ibrido TiO_2 +PCL12wt%+AMP5wt%

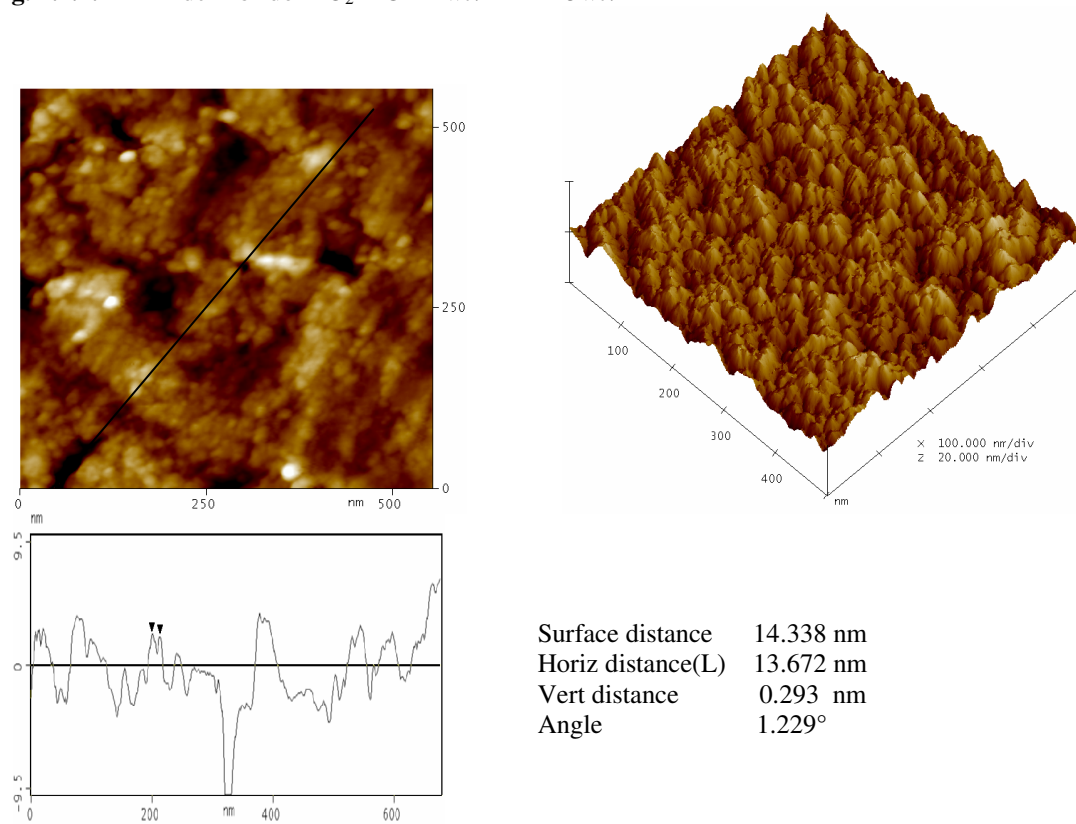


Fig. 4.4.2.8 AFM dell'ibrido TiO_2 +PCL24wt%+AMP5wt%

4.5 BIOATTIVITA'

4.5.1 Preparazione di SBF

Per studiarne la bioattività i vari campioni sono stati immersi, mantenendo la temperatura al valore costante di 37°C, in una soluzione simulante il fluido biologico (Simulated Body Fluid, SBF) per tempi diversi fino ad un massimo di 21 giorni, come previsto dai test di bioattività in vitro [139,154].

A tale scopo è stata preparata la soluzione di fluido biologico simulato (SBF), la cui composizione ionica millimolare è simile a quella del plasma sanguigno. I reagenti utilizzati, in opportune quantità, sono: NaCl, NaHCO₃, KCl, MgCl₂·6H₂O, CaCl₂, Na₂SO₄, Na₂HPO₄, Hepes (C₈H₁₈N₂O₄S) e NaOH 1M. Le concentrazioni degli ioni in SBF sono riportate in tabella VII.

Ioni	SBF (mM)	Plasma (mM)
Na ⁺	142,0	142,0
K ⁺	5,0	5,0
Mg ²⁺	1,5	1,5
Ca ²⁺	2,5	2,5
Cl ⁻	147,8	103,0
HCO ₃ ⁻	4,2	27,0
HPO ₄ ²⁻	1,0	1,0
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5

Tabella VII

4.5.2 Test di bioattività

I test di bioattività sono stati effettuati sui campioni ZrO₂-5wt%Y₂O₃+PCL (0, 6, 12 e 24wt%)+AMP5wt% e sui campioni TiO₂+PCL (0, 6, 12 e 24wt%)+AMP5wt% le cui polveri sono state compattate in pastiglie da 200 mg, aventi un diametro di 13mm e uno spessore di 2 mm. Tenendo conto che il rapporto della superficie totale (ST) del materiale a contatto con la soluzione SBF ed il volume V_{SBF} di tale soluzione influenzano il decorso della reazione [155,156], nei test di bioattività è utilizzato un rapporto costante ST/V_{SBF}=50mm²/ml.

Dalla Fig.4.5.1 possiamo osservare il meccanismo di formazione dell'apatite sui materiali incubati in SBF. I gruppi Zr-OH (lo stesso vale per i materiali a base di

TiO₂) presenti sulla superficie del materiale si combinano con gli ioni Ca²⁺ carichi positivamente, presenti nel fluido, formando lo zirconato di calcio. L'accumulo degli ioni calcio, permette l'aumento della carica positiva in superficie che a sua volta si combina con la carica negativa degli ioni fosfato per formare il calcio fosfato amorfo che spontaneamente si trasforma in idrossiapatite [Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂] dove il rapporto atomico Ca/P è 1.60 [157].

Le pasticche di materiale, dopo la permanenza in SBF, sono state sottoposte ad analisi al microscopio elettronico SEM ed EDS, attraverso le quali è stato confermato che uno strato di apatite cresce sulla superficie dei nostri campioni e il cui ammontare cresce in misura dipendente del contenuto di PCL (tabelle VIII-IX).

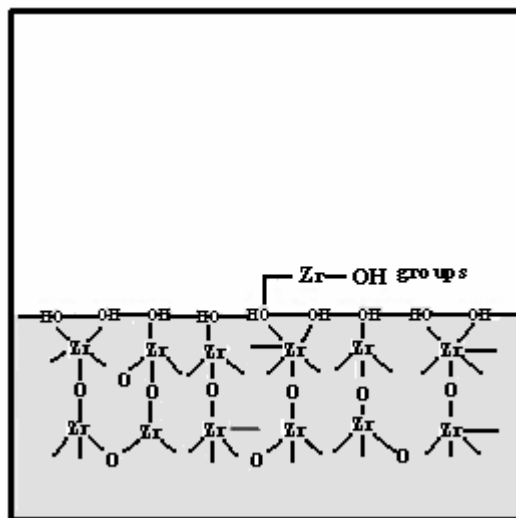
Di seguito sono riportati nelle Figs.4.5.2.2(a, b, c e d) le immagini al SEM con microanalisi relativi ai campioni ZrO₂-5wt%Y₂O₃+PCL(0, 6, 12 e 24wt%)+AMP5wt% rispettivamente dopo 21gg d'immersione; nelle Figs.4.5.2.3(a, b, c e d) sono riportate le immagini al SEM con le relative microanalisi dei campioni TiO₂+PCL(0, 6, 12 e 24wt%)+AMP5wt% dopo 21gg d'immersione.

21 giorni d'immersione in SBF	Contenuto di Ca	Contenuto di P
	% Atomico	% Atomico
ZrO ₂ -5wt%Y ₂ O ₃ +Amp5wt%	2.15	1.28
ZrO ₂ -5wt%Y ₂ O ₃ +PCL6wt%+Amp5wt%	3.20	2.01
ZrO ₂ -5wt%Y ₂ O ₃ +PCL12wt%+Amp5wt%	3.68	2.30
ZrO ₂ -5wt%Y ₂ O ₃ +PCL24wt%+Amp5wt%	8.73	5.45

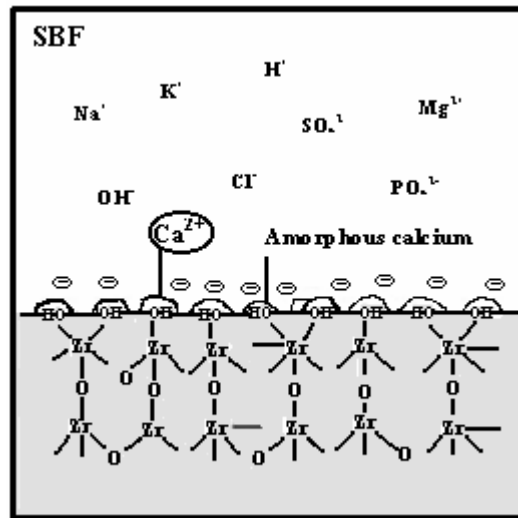
Tabella VIII

21 giorni d'immersione in SBF	Contenuto di Ca	Contenuto di P
	% Atomico	% Atomico
TiO ₂ +Amp5wt%	2.07	1.23
TiO ₂ +PCL6wt%+Amp5wt%	3.14	1.95
TiO ₂ +PCL12wt%+Amp5wt%	5.06	3.25
TiO ₂ +PCL24wt%+Amp5wt%	6.42	4.01

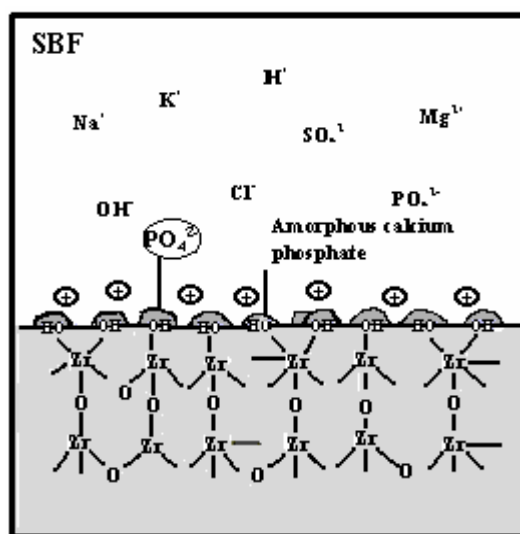
Tabella IX



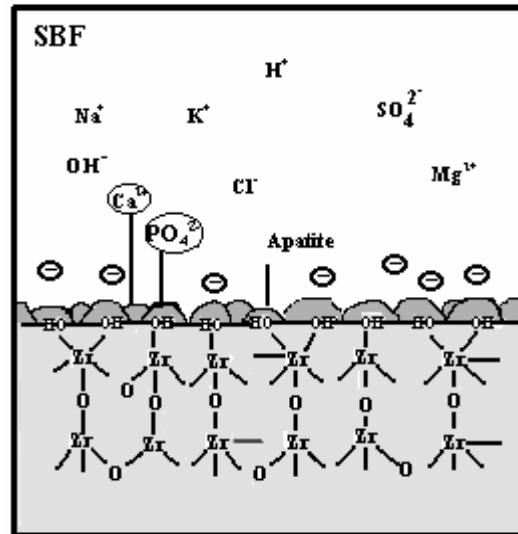
Prima dell'immersione in SBF



Formazione dello zirconato di calcio

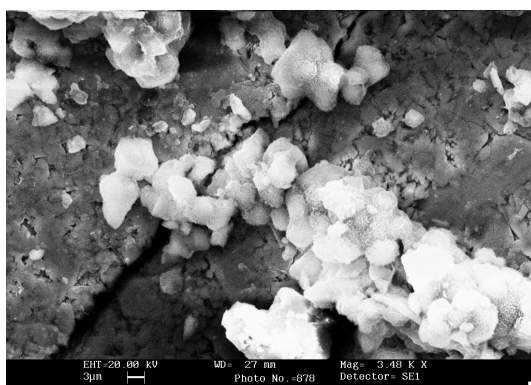


Formazione del calcio fosfato amorfo

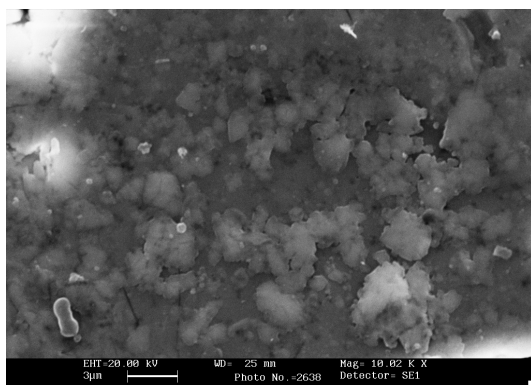
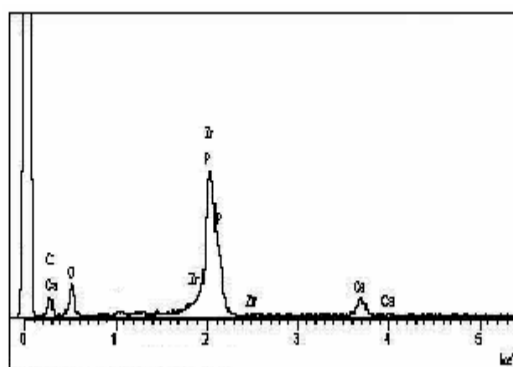


Formazione dell'apatite

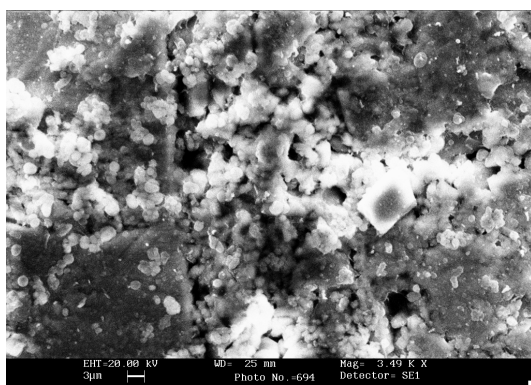
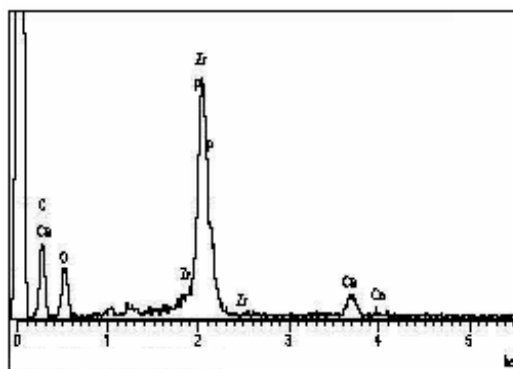
Fig 4.5.2.1 Meccanismo di formazione dell'apatite su materiali a base di ZrO_2



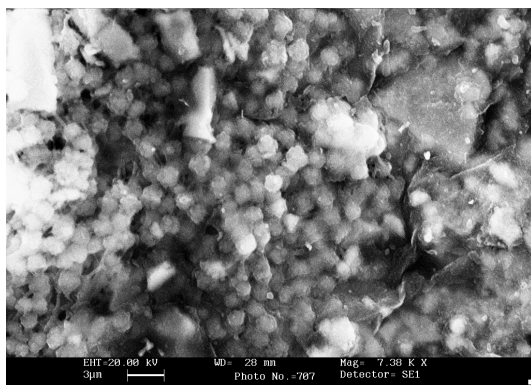
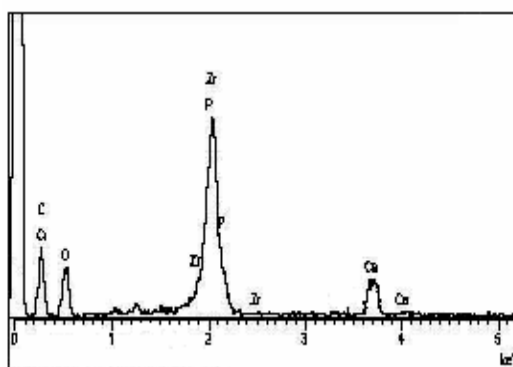
(a)



(b)



(c)



(d)

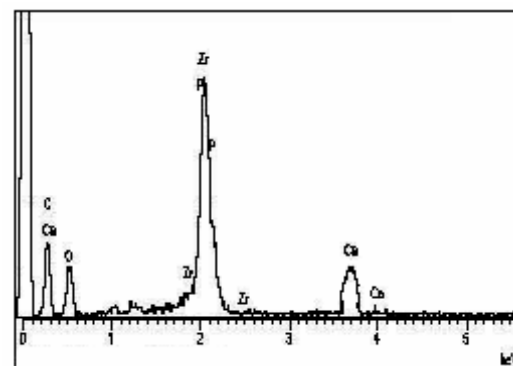


Fig. 4.5.2.2 SEM con relativa EDS dei campioni: a) $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+AMP5wt\%}$; b), c) e d) $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+PCL(6, 12 e 24\%)+AMP5wt\%}$ rispettivamente dopo 21gg d'immersione in SBF

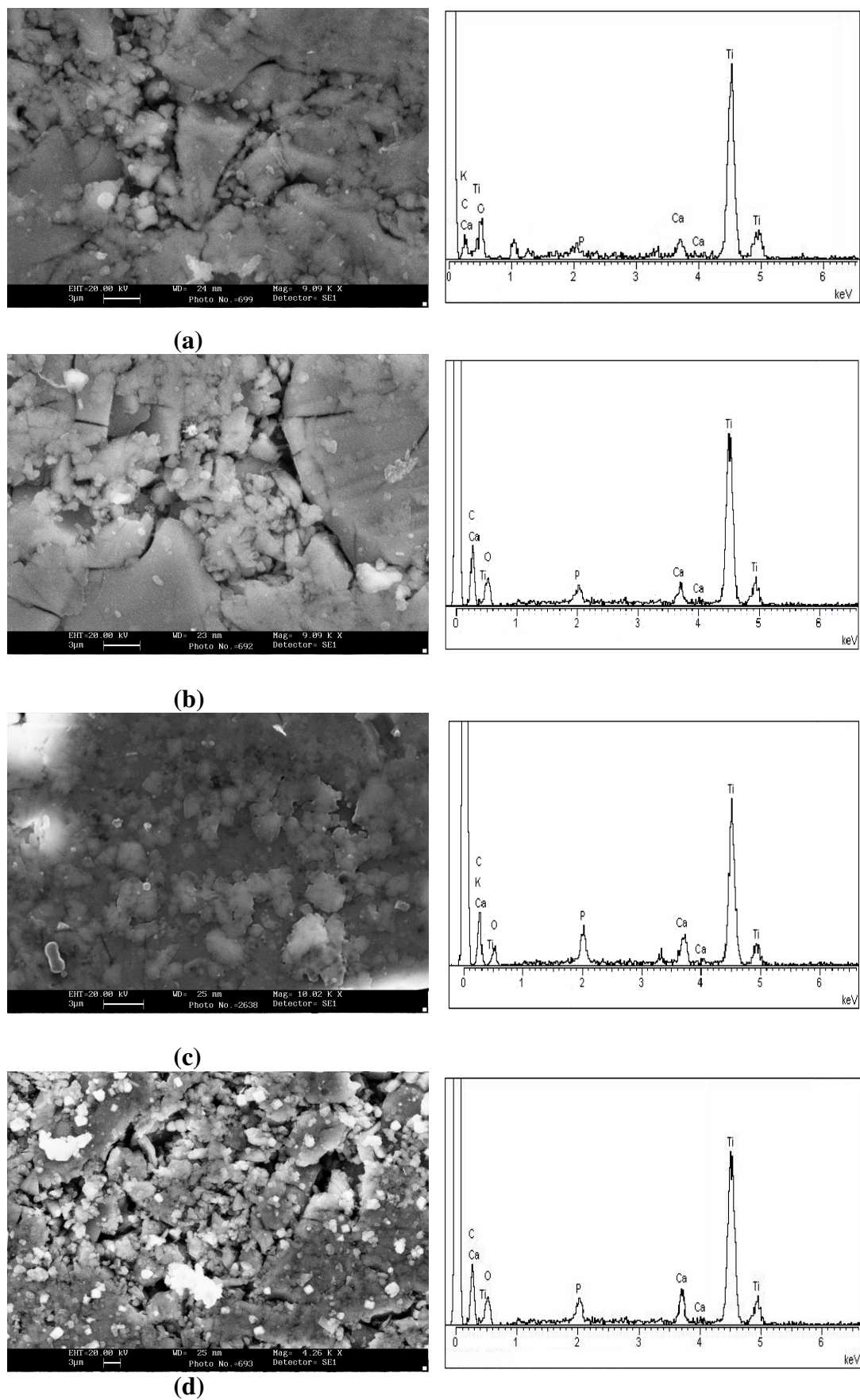


Fig. 4.5.2.2 SEM con relativa EDS dei campioni: a) $\text{TiO}_2 + \text{AMP} 5\text{wt}\%$; b), c) e d) $\text{TiO}_2 + \text{PCL}(6, 12 \text{ e } 24\%) + \text{AMP} 5\text{wt}\%$ rispettivamente dopo 21gg d'immersione in SBF

4.6 BIOCOMPATIBILITA'

4.6.1 Test di biocompatibilità

Per poter essere sottoposti alla sperimentazione in vitro i campioni: ZrO_2 -5wt% Y_2O_3 +PCL(0, 6, 12 e 24wt%)+AMP(0 e 5wt%) e TiO_2 +PCL(0, 6, 12 e 24wt%)+AMP(0 e 5wt%) sono stati preventivamente sottoposti a lavaggi con esano per poter stabilizzare il pH, in quanto i materiali oggetto di studio sono particolarmente acidi pH=3.50. Per questo motivo sono stati incubati in esano per 3 giorni sotto agitazione, per rimuovere eventuali residui che ne determinano l'acidità, e successivamente lavati e reincubati in una soluzione di PBS; in questo modo si è potuto stabilizzare il pH=6.50. Il passo successivo è stato quello di sterilizzare i materiali mediante autoclave (20 minuti a 121°C) e mediante sterilizzazione con radiazioni γ . Per quest'ultimo metodo di sterilizzazione non sono stati considerati i campioni con ampicillina, perché la struttura di quest'ultima potrebbe essere alterata dalle radiazioni γ . Sono stati effettuati entrambi i metodi di sterilizzazione per poter valutare gli effetti della sterilizzazione sulla risposta cellulare, quindi determinare il modo migliore per poter sterilizzare i materiali oggetto di studio. I tests che sono stati eseguiti sono test di citotossicità indiretto (MTT Test) e test diretto (Alamar Blue). Per MTT test sono stati considerati campioni sottoforma di polveri e quelli compressati in pasticche, sterilizzati con autoclave e con radiazioni γ . Per Alamar blue test sono stati considerati solo i campioni le cui polveri sono state preventivamente compresse in pasticche e sterilizzati con autoclave e radiazioni γ . Le cellule utilizzate in questo studio sono cellule primarie di osteoblasti HOB ottenute dalla testa di un femore espantato. Le cellule sono state isolate usando un protocollo preventivamente stabilito [10,11]. Le cellule sono state messe in un completo mezzo di coltura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), supplementato con il 10% di siero fetale FCS, 1% di aminoacidi non-essenziali (MEM), acido ascorbico, penicillina/streptomina 100x, L-glutamina 200mM e tampone HEPES 1M. Le cellule sono state fatte espandere per diversi passaggi; le HOBs utilizzate per MTT test sono al 25° passaggio (P25) quelle per l'Alamar Blue al 15° passaggio (P15).

I tests di biocompatibilità sono stati eseguiti presso il Dental Biomaterials Science Department del King's College London, avendo come tutor Dr Lucy Di Silvio.

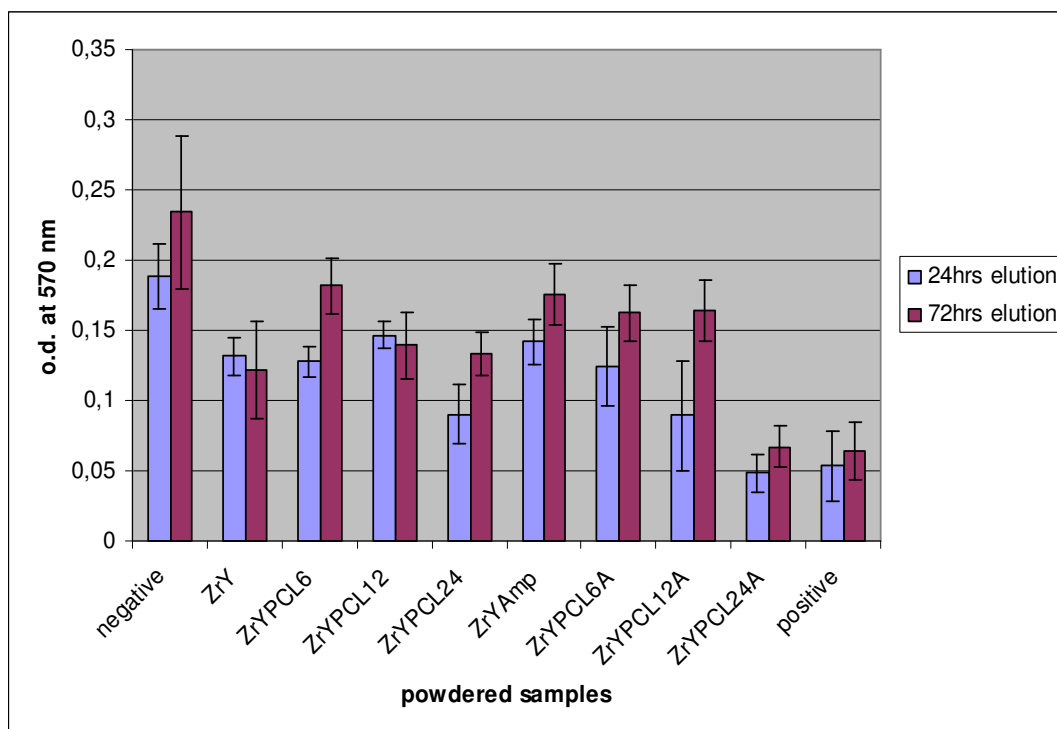
4.6.2 MTT test

I campioni $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+PCL(0, 6, 12 e 24wt\%)+AMP(0 e 5wt\%)}$ e $\text{TiO}_2\text{+PCL(0, 6, 12 e 24wt\%)+AMP(0 e 5wt\%)}$ sono stati sterilizzati sia in autoclave che con radiazioni γ . Il protocollo seguito per questo test è il seguente:

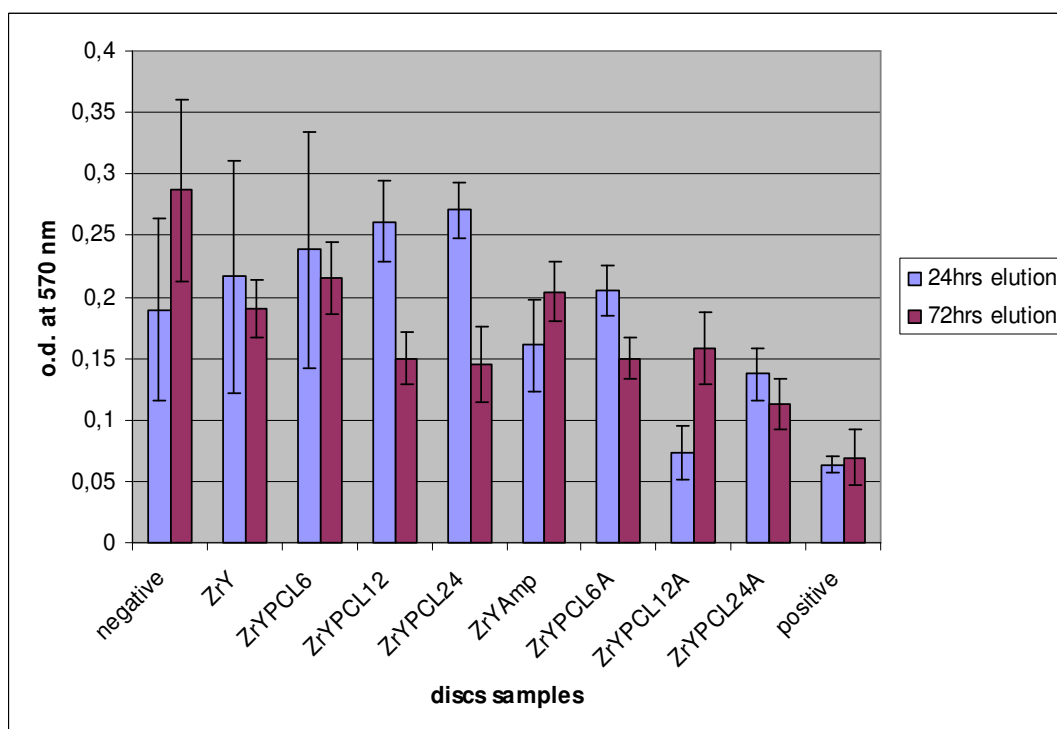
- I materiali sono stati messi a contatto con 2mL di DMEM per 24hrs e 72hrs, in modo da ottenere l'eluato corrispondente a questi periodi di contatto.
- Sono stati preparati i controlli negativo e positivo, il primo consiste solo del mezzo di coltura DMEM, mentre il controllo positivo consiste di $\text{DMEM+C}_2\text{H}_5\text{OH}$. Questi controlli sono importanti per poter valutare l'andamento della crescita cellulare.
- Le cellule sono state tripsinizzate dalle fiasche e messe in piastra circa $1.24 \cdot 10^4$ cellule per 100 μL ; sono state lasciate in incubatore per 48hrs fino a diventare confluenti.
- Dalle piastre è stato tolto il mezzo di coltura (100 μL) ed è stato aggiunto l'eluato (100 μL) dei campioni a 24hrs e 72hrs; a questo punto le piastre sono state messe in incubatore per altre 48hrs.
- Dopo il periodo di incubazione dalle piastre è stato rimosso l'eluato e ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 μL di soluzione MTT e posti in incubatore di CO_2 per altre 4hrs.
- A questo punto è stata rimossa la soluzione e aggiunto DMSO (Dimetilsolfossido) 100 μL , sono state messe su uno shaker per 5 minuti e poi è stata letta l'assorbanza; la lunghezza d'onda del riferimento è 630nm, quella del test 570nm.

I risultati sono riportati in Fig.4.6.2.1(a,b) per i campioni $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+PCL(0, 6, 12 e 24wt\%)+AMP(0 e 5wt\%)}$, polveri e sotto forma di dischi, sterilizzati in autoclave e allo stesso modo in Fig.4.6.1.2 (a,b) per i campioni $\text{TiO}_2\text{+PCL(0, 6, 12 e 24wt\%)+AMP(0 e 5wt\%)}$. In Figs.4.6.2.3-4.6.2.4 (a,b) sono riportati i risultati dei materiali sterilizzati con radiazioni γ . Per entrambe le serie di materiali sono state fatte osservazioni al microscopio ottico dove è possibile evidenziare la morfologia delle cellule e il loro espandersi dopo le 24hrs e 72hrs (Figs.4.6.2.5-4.6.2.6). Risultati non soddisfacenti si sono avuti per i campioni $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+PCL24wt\%+Amp5wt\%}$ e $\text{TiO}_2\text{+PCL24wt\%+Amp5wt\%}$ dove, invece, si osserva sia dai grafici che dalla microscopia una bassa proliferazione cellulare. Questa situazione potrebbe essere spiegata dal fatto che i materiali al 24wt% di PCL

presentano un rilascio più lento e prolungato di conseguenza, anche se i materiali sono stati preventivamente lavati con esano e PBS, solo una piccola parte di antibiotico è stata persa nel mezzo mentre la maggior parte sarà rilasciata nel mezzo di coltura dove cellula si troverà in un ambiente saturo di antibiotico. Questo non accade con i materiali a più basso contenuto di polimero in quanto hanno un rilascio più veloce, in accordo con lo studio di rilascio di tali materiali, e quindi la maggior parte del principio attivo è stata persa durante il lavaggio, ciò determina che la cellula si troverà in una condizione di un giusto apporto di principio attivo.

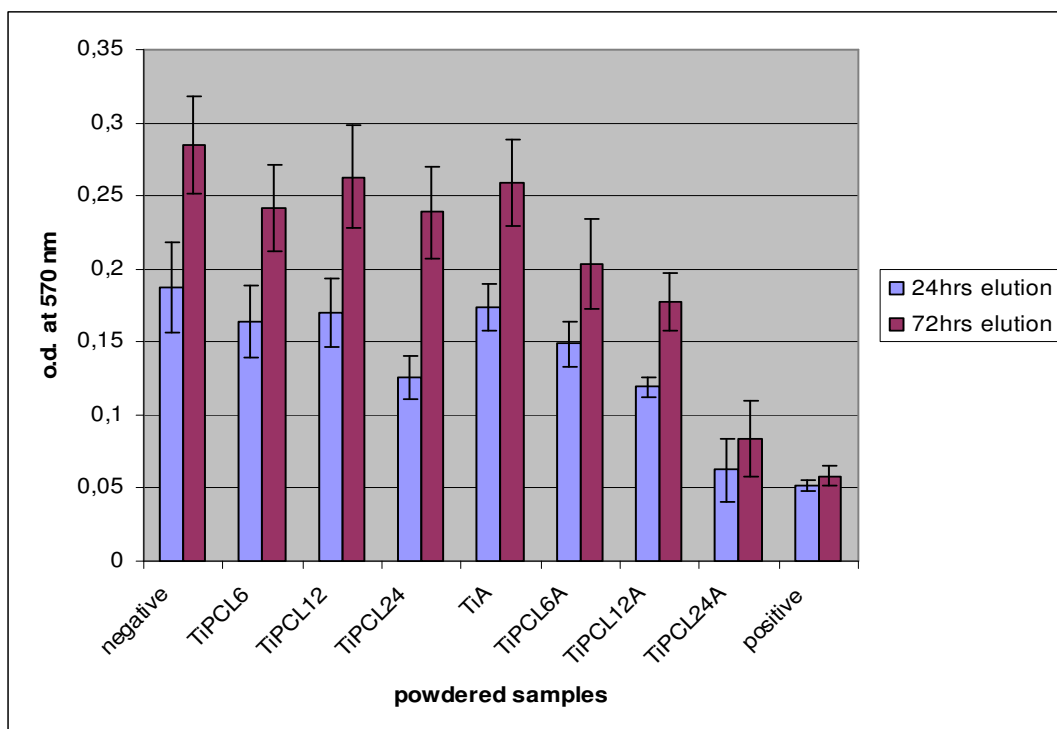


(a)

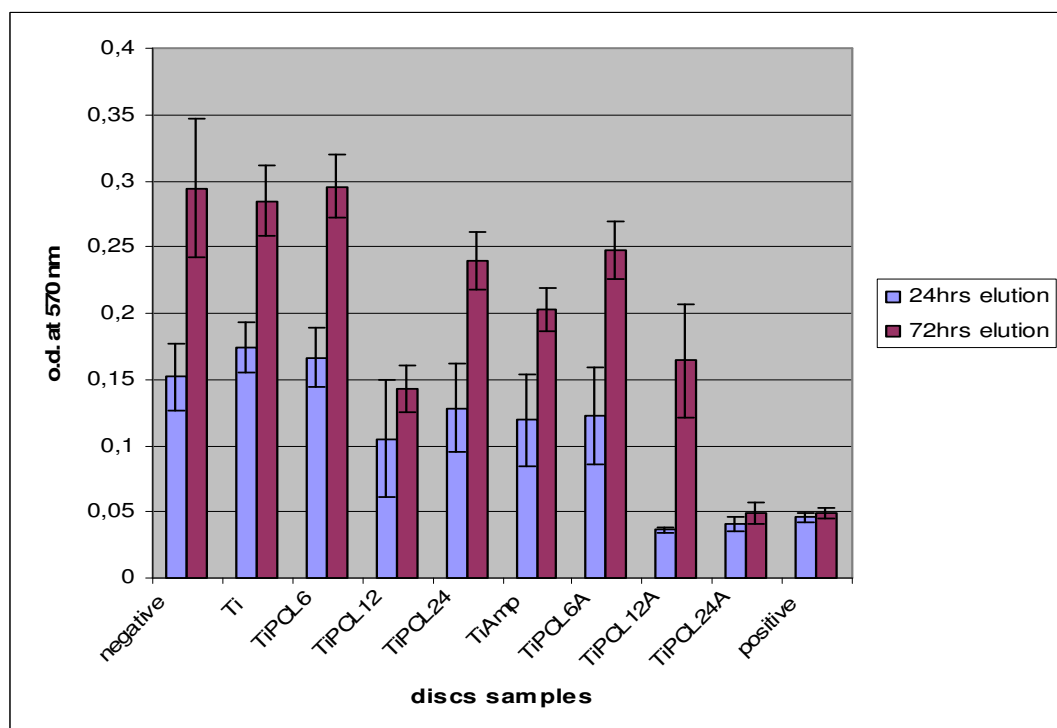


(b)

Fig. 4.6.2.1 MTT test campioni $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+PCL(0, 6, 12 e 24wt\%)+AMP(0 e 5wt\%)}$ sterilizzati in autoclave (121°C per 20min): (a) campioni in polvere; (b) polveri compresse in dischi

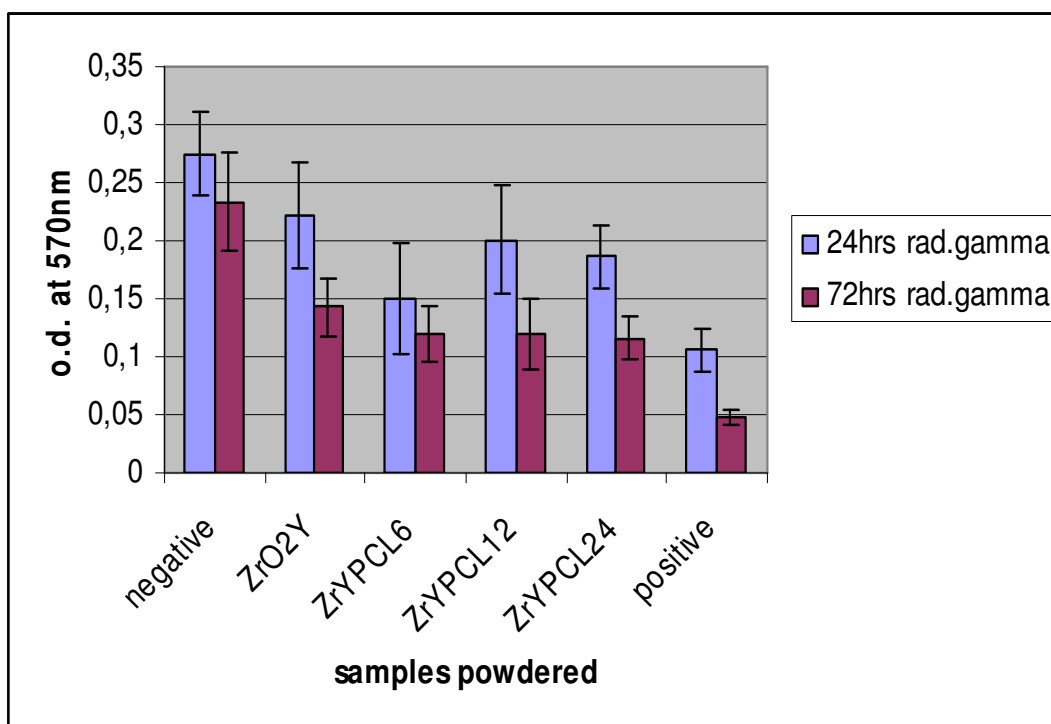


(a)

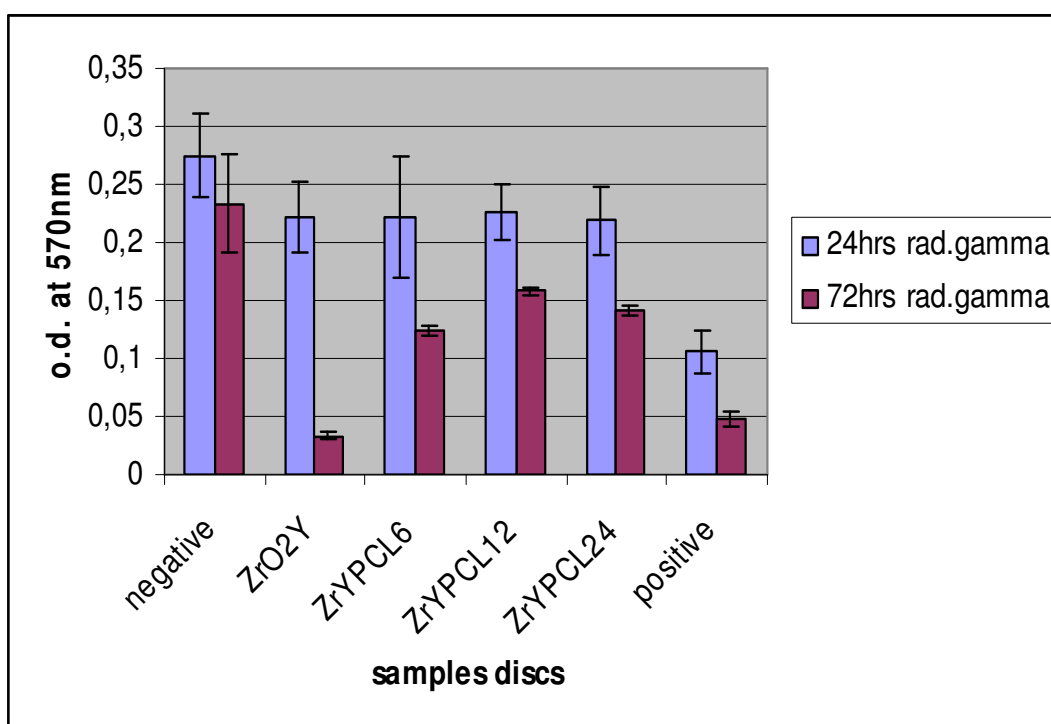


(b)

Fig. 4.6.2.2 MTT test campioni TiO_2 +PCL(0, 6, 12 e 24wt%)+AMP(0 e 5wt%) sterilizzati in autoclave (121°C per 20min): (a) campioni in polvere; (b) polveri compresse in dischi.

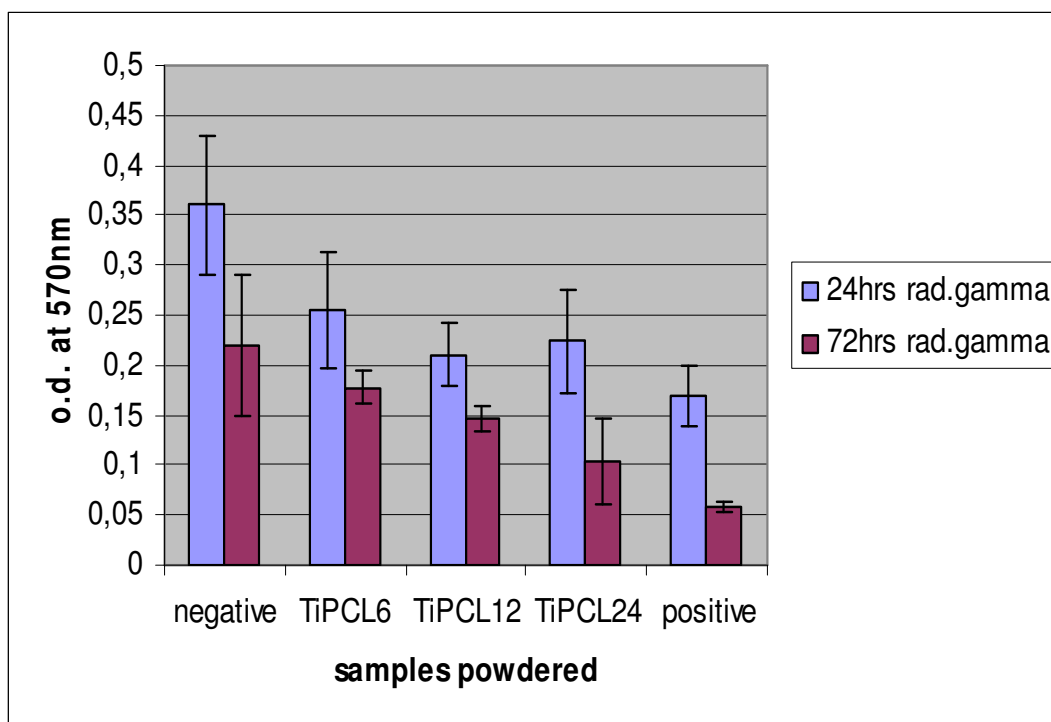


(a)

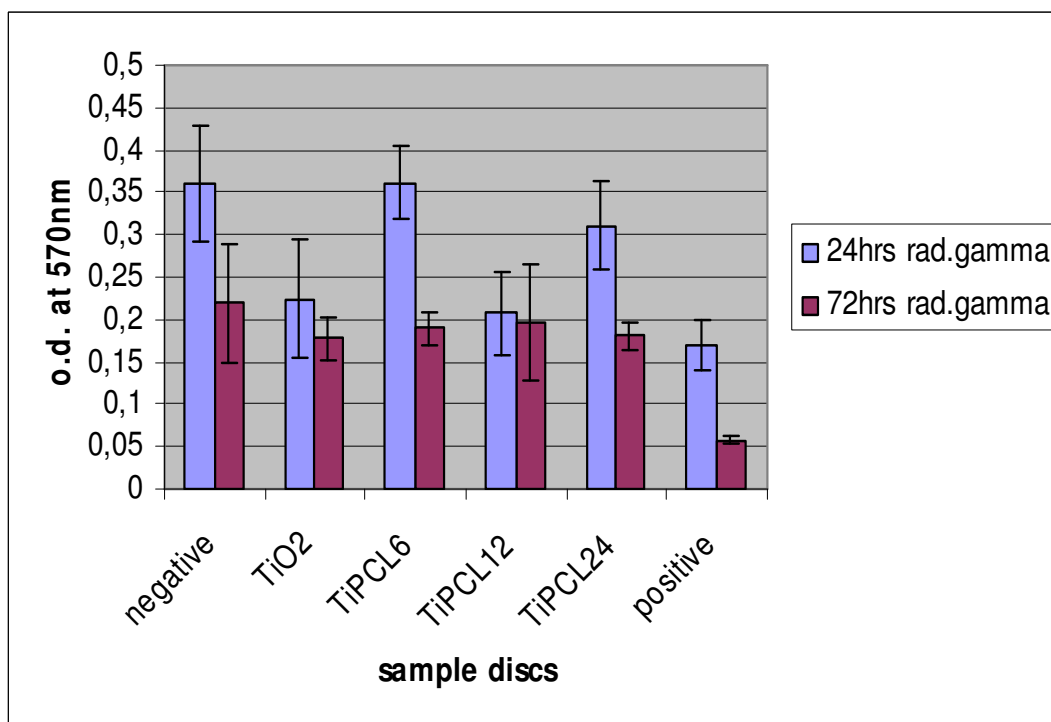


(b)

Fig. 4.6.2.3 MTT test campioni ZrO₂-5wt%Y₂O₃+PCL(0, 6, 12 e 24wt%)+AMP(0 e 5wt%) sterilizzati con radiazioni γ (121°C per 20min): (a) campioni in polvere; (b) polveri compresse in dischi

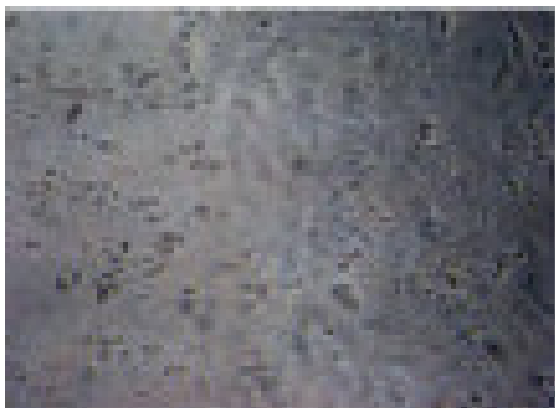


(a)



(b)

Fig. 4.6.2.4 MTT test campioni TiO_2 +PCL(0, 6, 12 e 24wt%)+AMP(0 e 5wt%) sterilizzati con radiazioni γ : (a) campioni in polvere; (b) polveri compresse in dischi



Controllo negativo a 24hrs



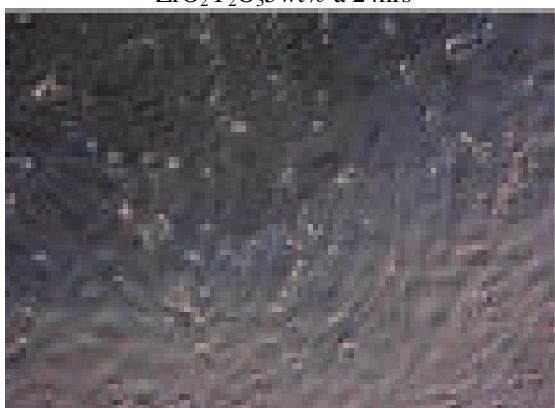
Controllo negativo a 72hrs



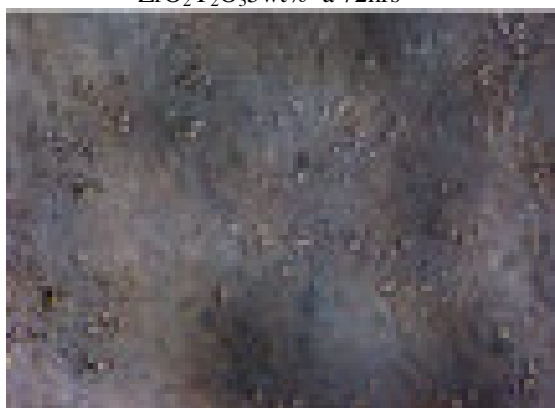
$\text{ZrO}_2\text{Y}_2\text{O}_3$ 5wt% a 24hrs



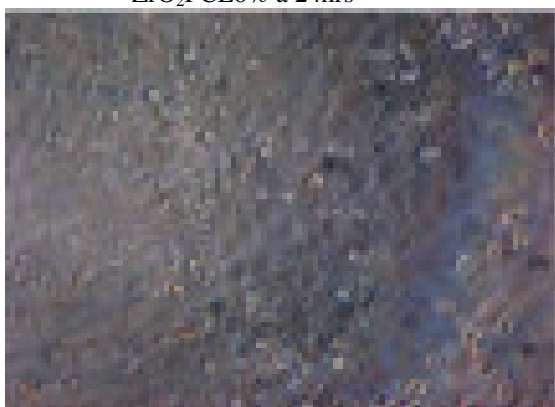
$\text{ZrO}_2\text{Y}_2\text{O}_3$ 5wt% a 72hrs



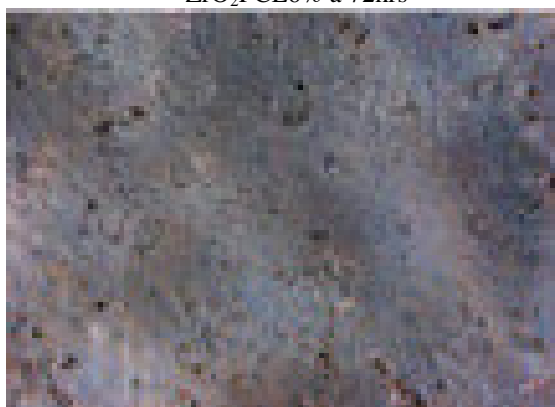
ZrO_2PCL 6% a 24hrs



ZrO_2PCL 6% a 72hrs



ZrO_2PCL 12% a 24hrs



ZrO_2PCL 12% a 72hrs

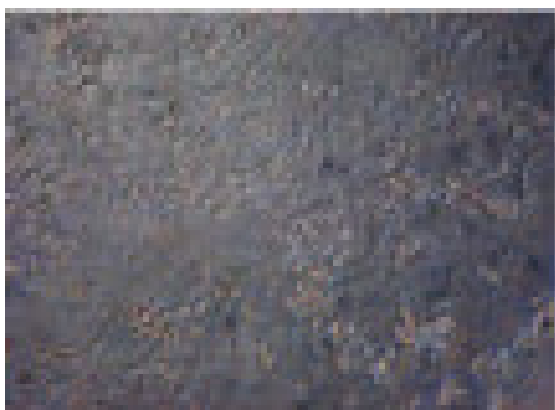


ZrO₂PCL24% a 24hrs

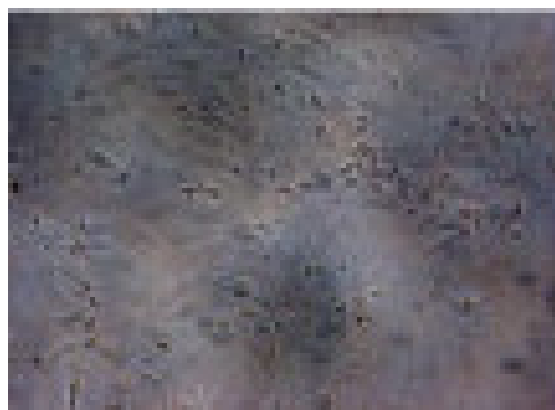


ZrO₂PCL24% a 72hrs

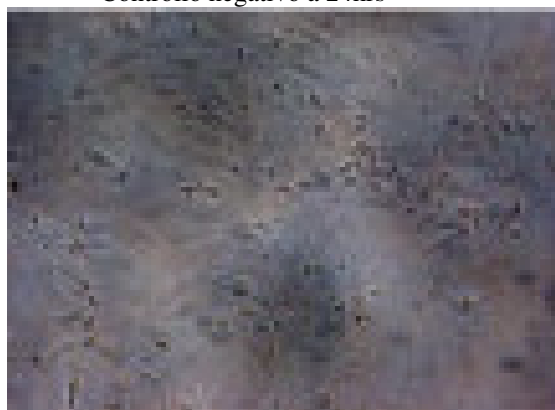
(a)



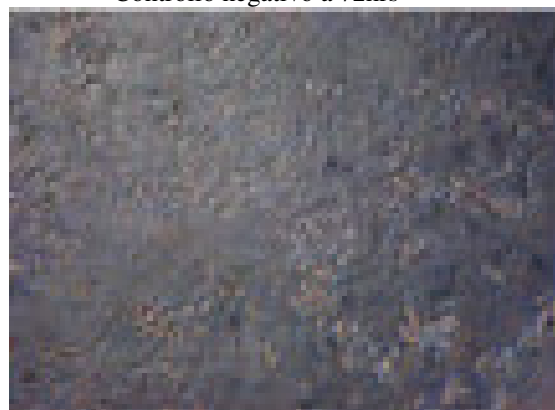
Controllo negativo a 24hrs



Controllo negativo a 72hrs



ZrO₂Amp5% a 24hrs



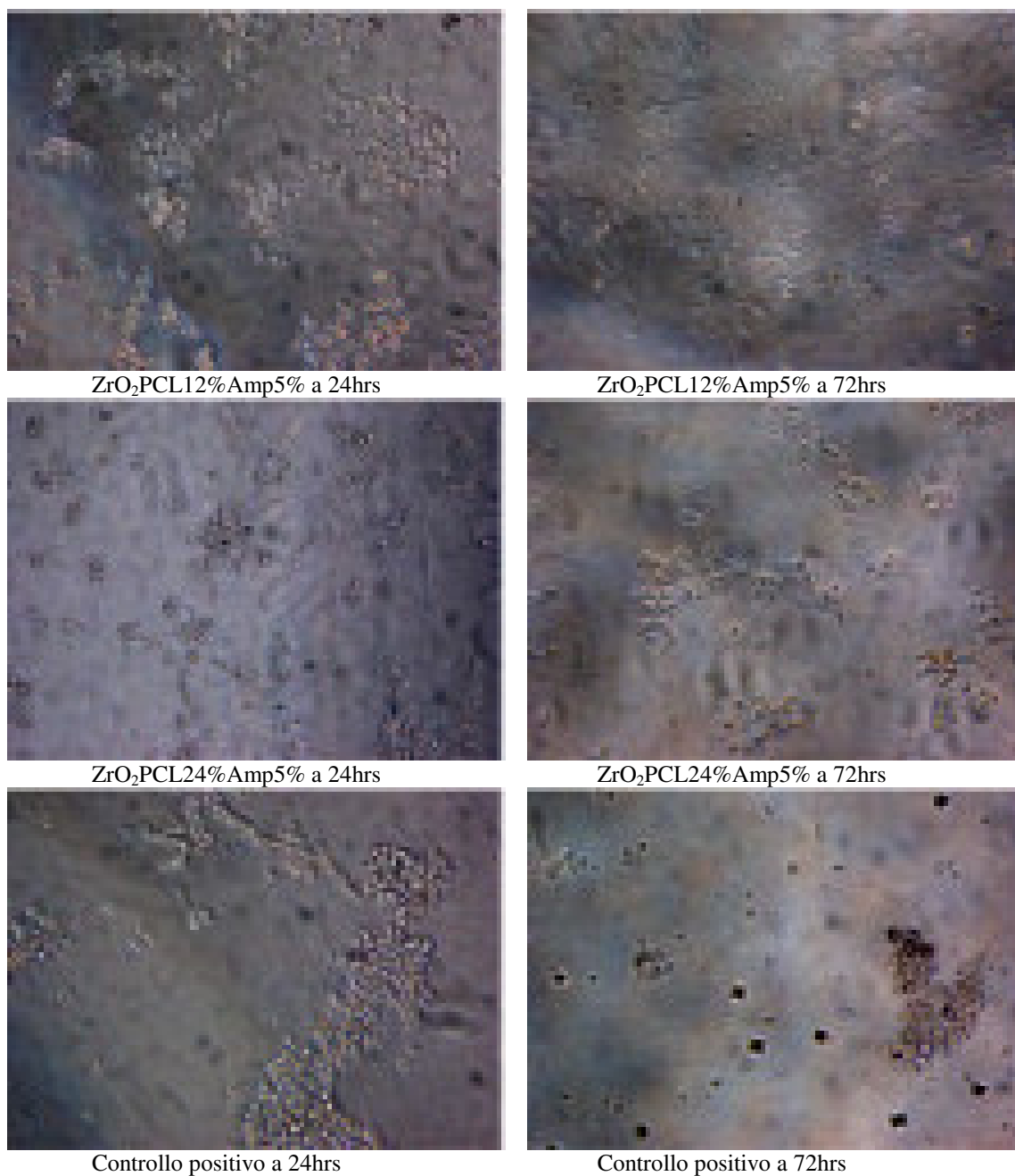
ZrO₂Amp5% a 72hrs



ZrO₂PCL6%Amp5% a 24hrs



ZrO₂PCL6%Amp5% a 72hrs



(b)

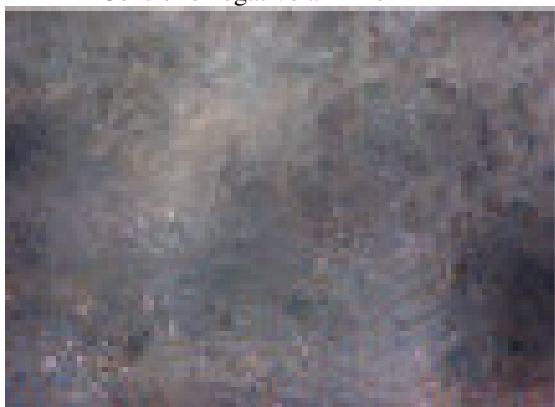
Fig. 4.6.2.5 Osservazioni al microscopio ottico (20X): a) campioni sottoforma di dischi di ZrO₂Y+PCL(0, 6, 12 e 24wt%) a 24 e 72hrs (121°C per 20min); (b) ZrO₂Y+PCL(0, 6, 12 e 24wt%)+Amp5% a 24 e 72hrs sterilizzati con autoclave (121°C per 20min)



Controllo negativo a 24hrs



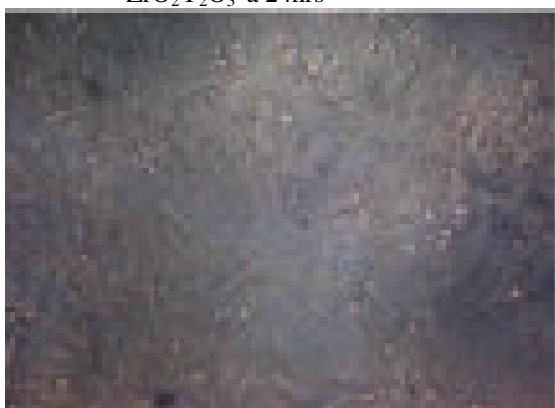
Controllo negativo a 72hrs



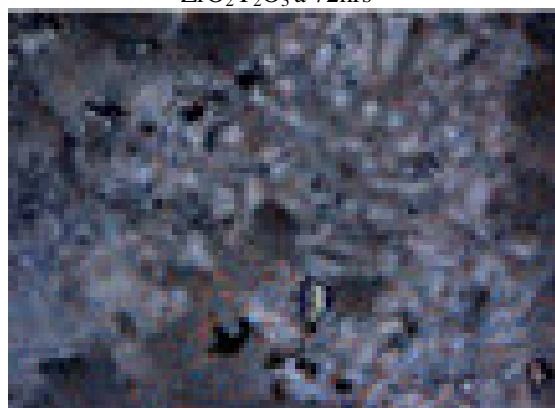
$\text{ZrO}_2\text{Y}_2\text{O}_3$ a 24hrs



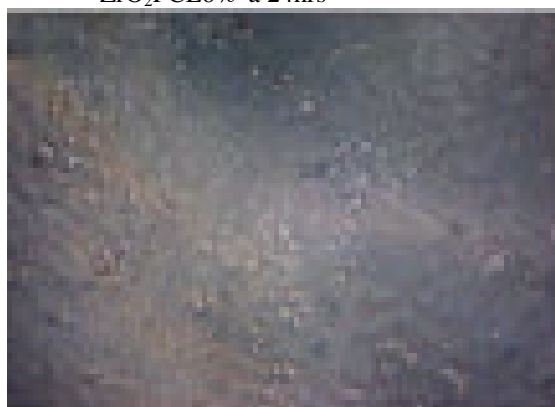
$\text{ZrO}_2\text{Y}_2\text{O}_3$ a 72hrs



$\text{ZrO}_2\text{PCL}6\%$ a 24hrs



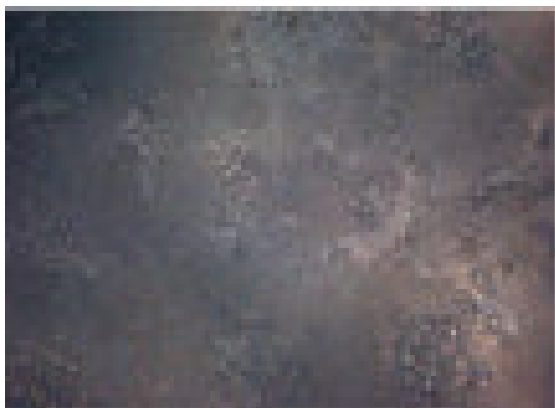
$\text{ZrO}_2\text{PCL}6\%$ a 72hrs



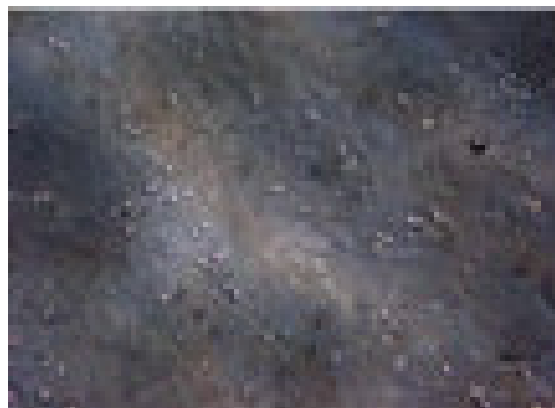
$\text{ZrO}_2\text{PCL}12\%$ a 24hrs



$\text{ZrO}_2\text{PCL}12\%$ a 72hrs



ZrO₂PCL24% a 24hrs

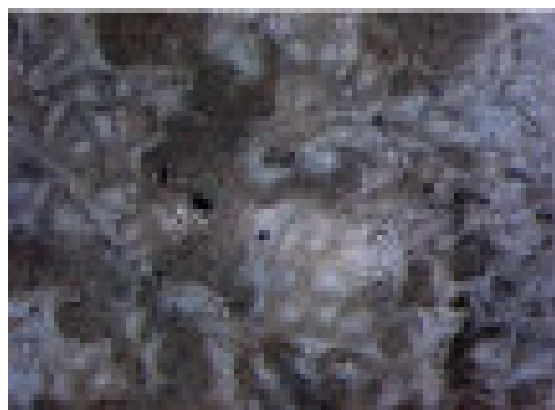


ZrO₂PCL24% a 72hrs

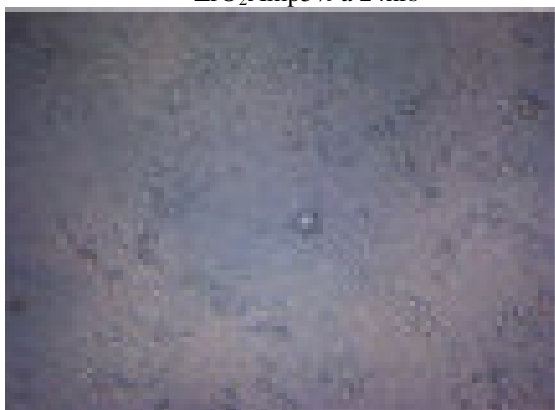
(a)



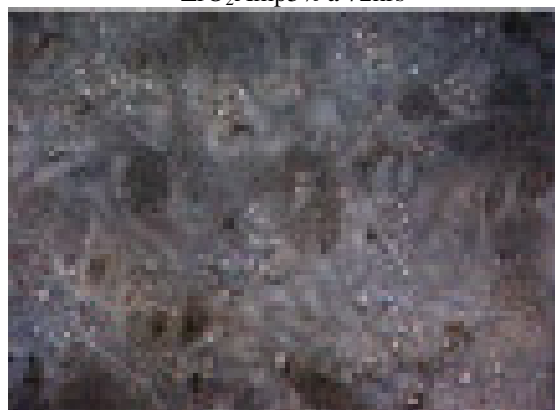
ZrO₂Amp5% a 24hrs



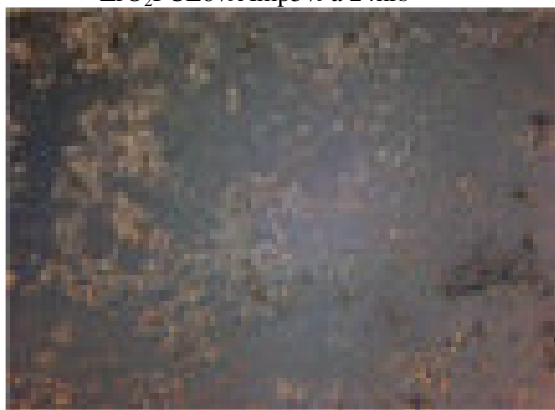
ZrO₂Amp5% a 72hrs



ZrO₂PCL6%Amp5% a 24hrs



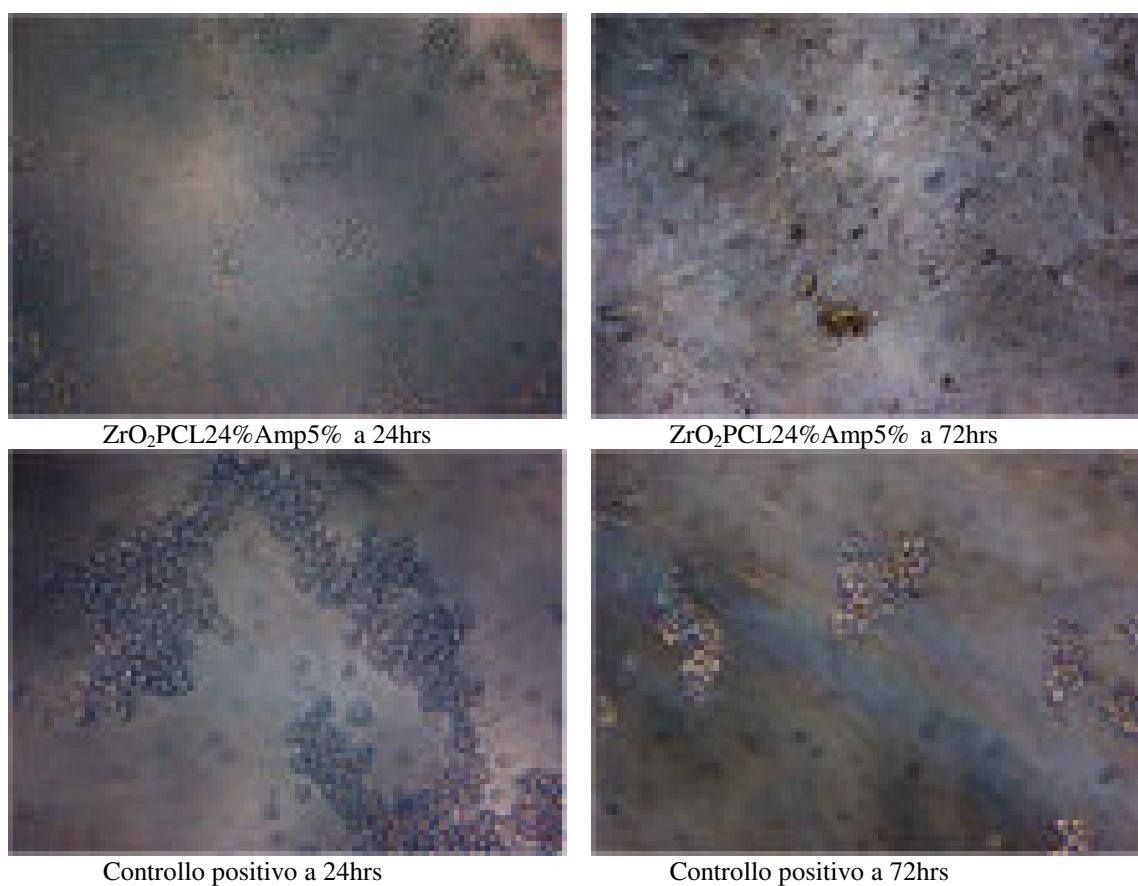
ZrO₂PCL6%Amp5% a 72hrs



ZrO₂PCL12%Amp5% a 24hrs



ZrO₂PCL12%Amp5% a 72hrs



(b)

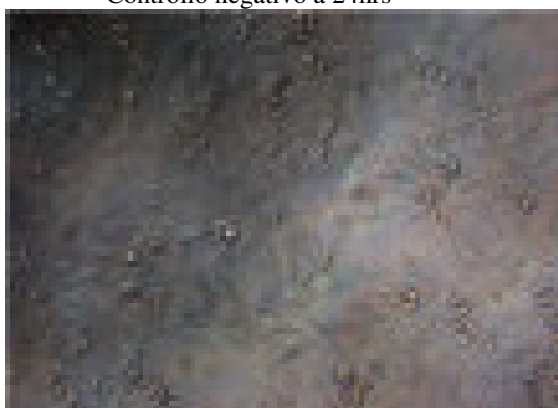
Fig.4.6.2.6 Osservazioni al microscopio ottico (20X): (a) campioni sottoforma di polveri di ZrO₂YPCL(0, 6, 12 e 24wt%) a 24 e 72hrs; (b) ZrO₂YPCL(0, 6, 12 e 24wt%)Amp5% a 24 e 72hrs sterilizzati con autoclave (121°C per 20min)



Controllo negativo a 24hrs



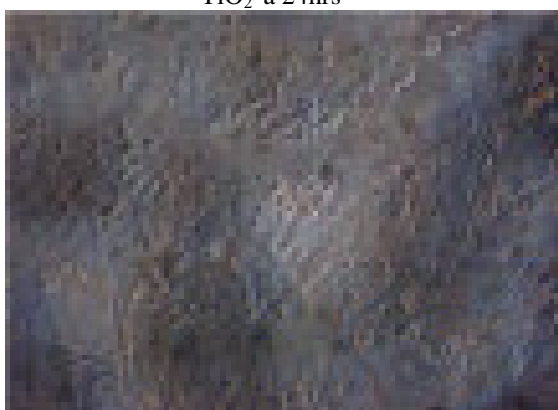
Controllo negativo a 72hrs



TiO₂ a 24hrs



TiO₂ a 72hrs



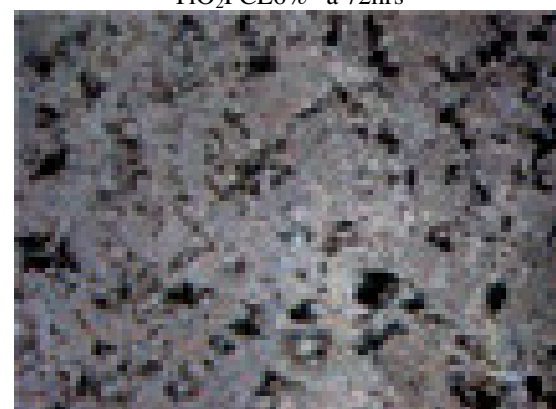
TiO₂PCL6% a 24hrs



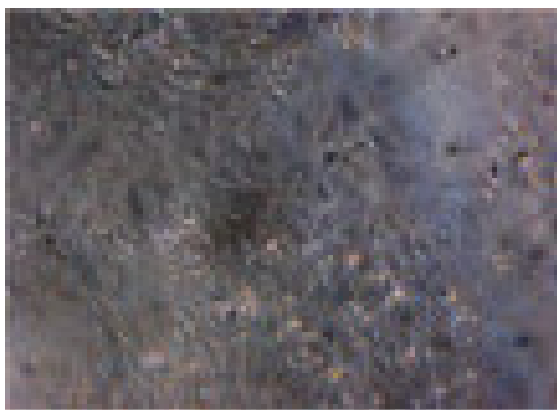
TiO₂PCL6% a 72hrs



TiO₂PCL12% a 24hrs



TiO₂PCL12% a 24hrs

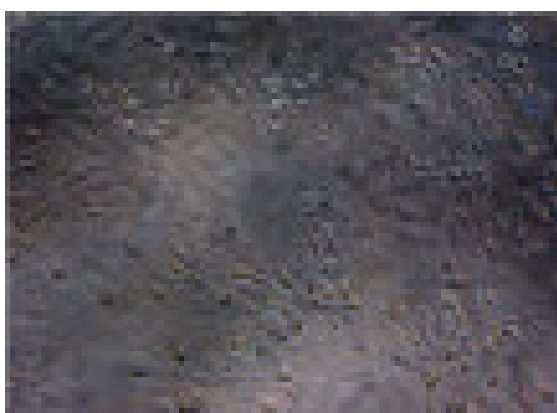


TiO₂PCL24% a 24hrs



TiO₂PCL24% a 72hrs

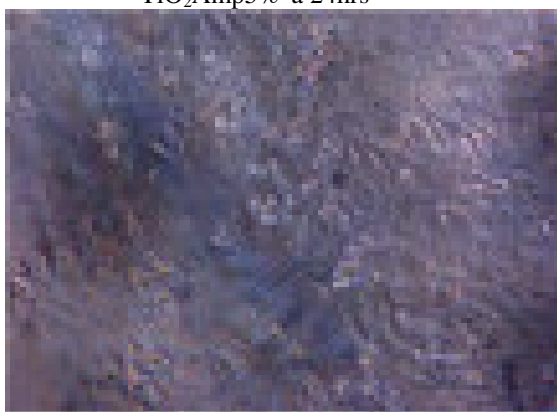
(a)



TiO₂Amp5% a 24hrs



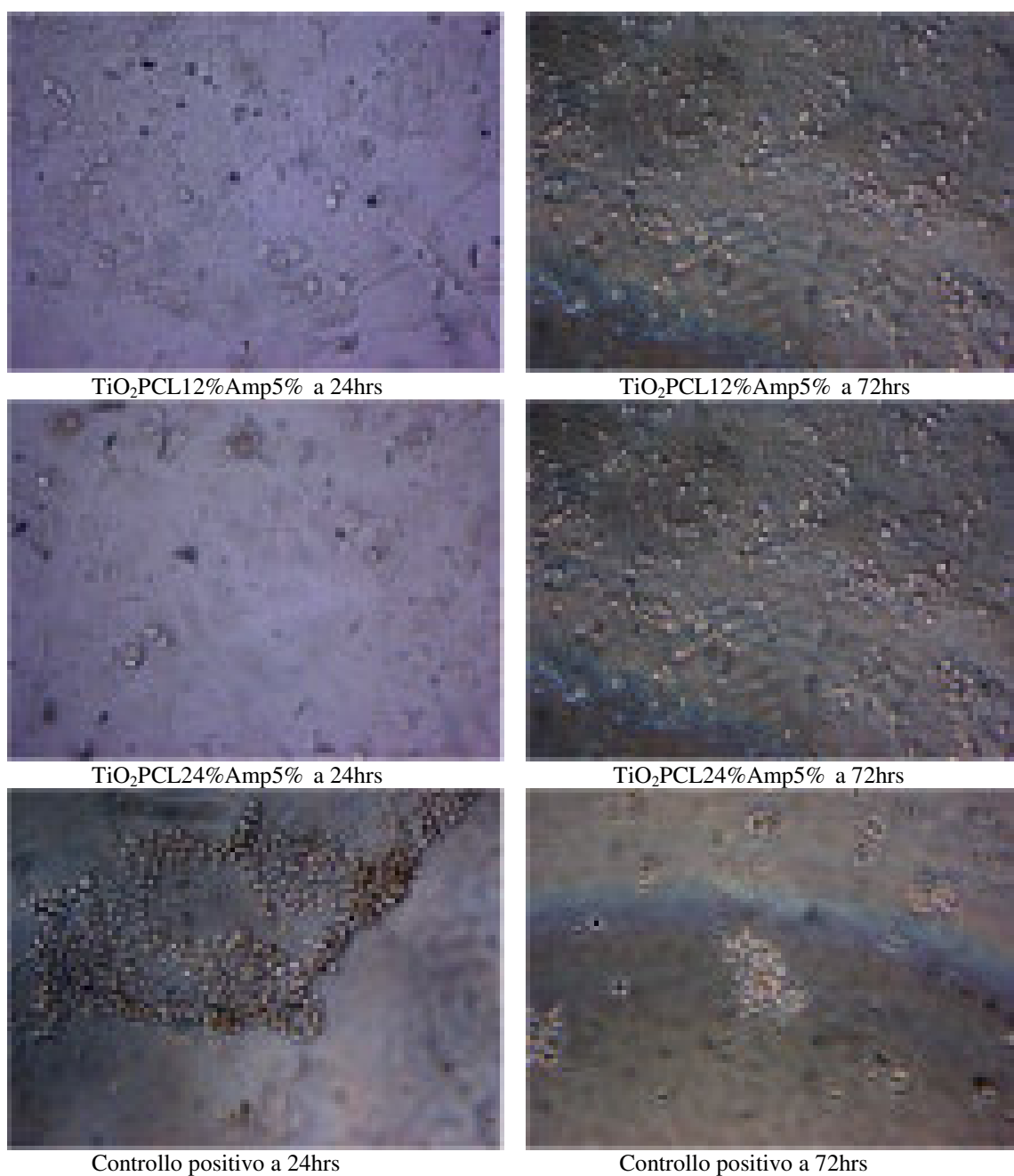
TiO₂Amp5% a 72hrs



TiO₂PCL6%Amp5% a 24hrs



TiO₂PCL6%Amp5% a 72hrs



(b)

Fig. 4.6.2.7 Osservazioni al microscopio ottico (20X): (a) campioni sottoforma di dischi di TiO₂PCL(0, 6, 12 e 24wt%) a 24 e 72hrs; (b) campioni sottoforma di dischi di TiO₂PCL(0, 6, 12 e 24wt%)Amp5% a 24 e 72hrs



Controllo negativo a 24hrs



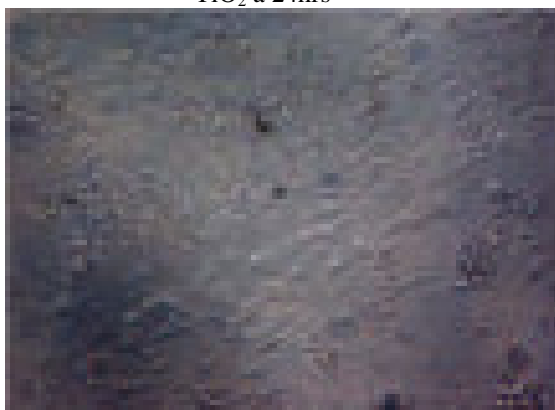
Controllo negativo a 72hrs



TiO₂ a 24hrs



TiO₂ a 72hrs



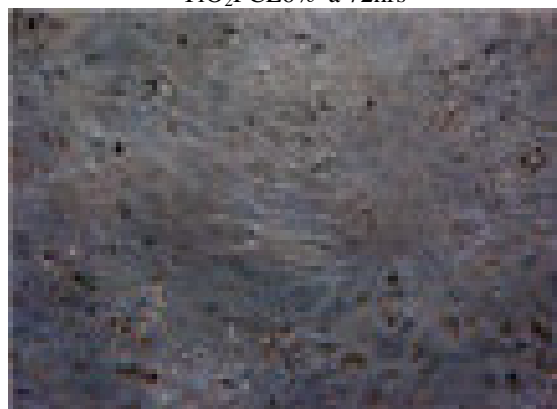
TiO₂PCL6% a 24hrs



TiO₂PCL6% a 72hrs



TiO₂PCL12% a 24hrs



TiO₂PCL12% a 72hrs



TiO₂PCL24% a 24hrs



TiO₂PCL24% a 72hrs

(a)



TiO₂Amp5% a 24hrs



TiO₂Amp5% a 72hrs



TiO₂PCL6%Amp5% a 24hrs



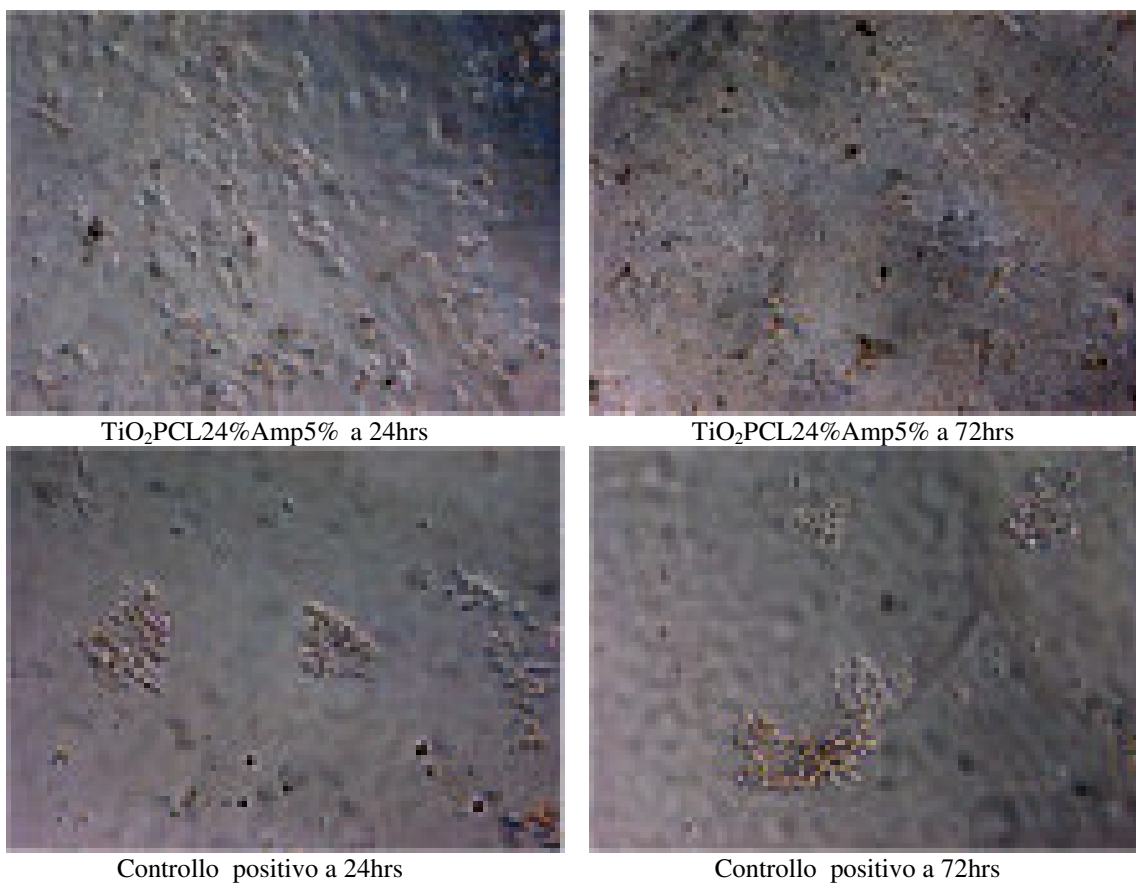
TiO₂PCL6%Amp5% a 72hrs



TiO₂PCL12%Amp5% a 24hrs



TiO₂PCL12%Amp5% a 72hrs



(b)

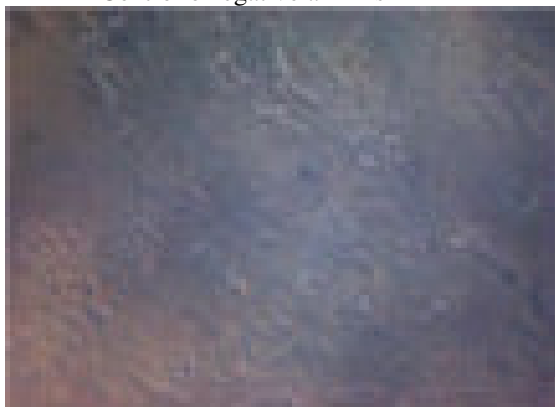
Fig. 4.6.2.8 Osservazioni al microscopio ottico (20X): (a) campioni sottoforma di polveri di TiO₂PCL(0, 6, 12 e 24wt%) a 24 e 72hrs; (b) TiO₂PCL(0, 6, 12 e 24wt%) Amp5% a 24 e 72hrs (121°C per 20min) sterilizzati in autoclave (121°C per 20min)



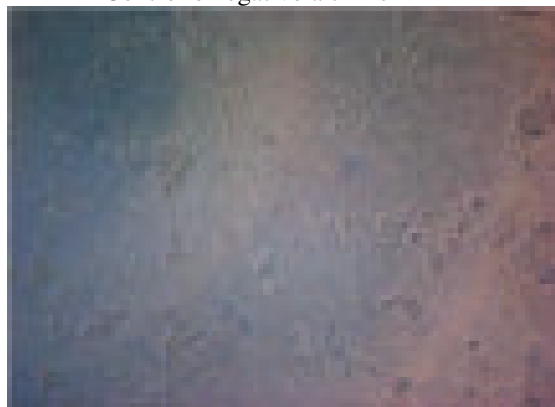
Controllo negativo a 24hrs



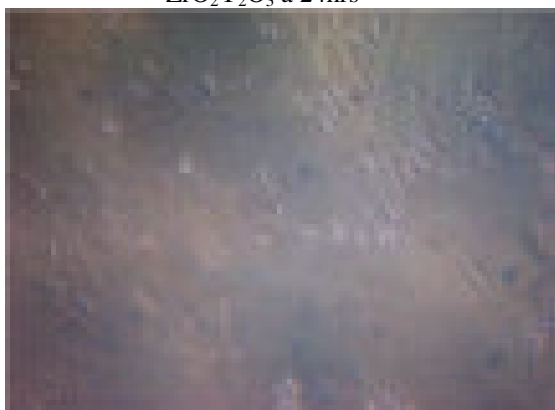
Controllo negativo a 72hrs



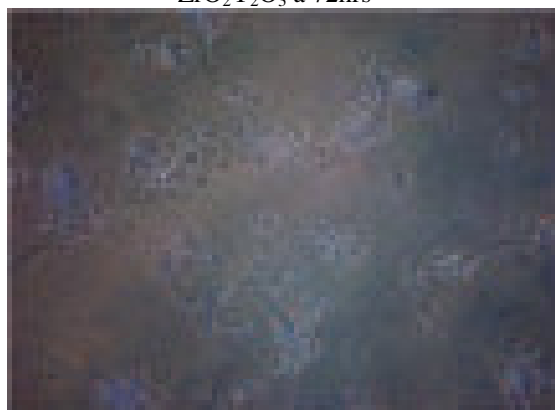
$\text{ZrO}_2\text{Y}_2\text{O}_3$ a 24hrs



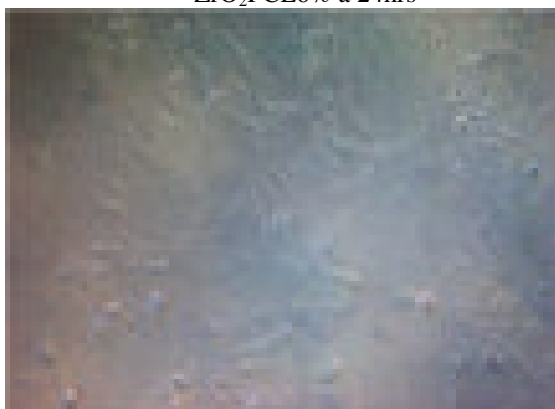
$\text{ZrO}_2\text{Y}_2\text{O}_3$ a 72hrs



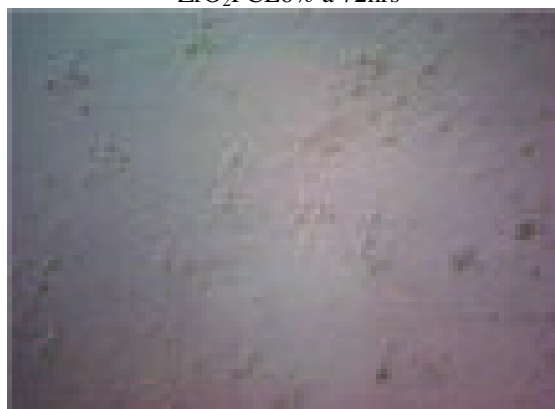
$\text{ZrO}_2\text{PCL6\%}$ a 24hrs



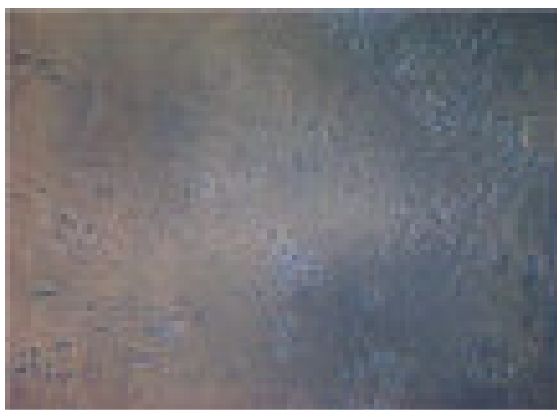
$\text{ZrO}_2\text{PCL6\%}$ a 72hrs



$\text{ZrO}_2\text{PCL12\%}$ a 24hrs



$\text{ZrO}_2\text{PCL12\%}$ a 72hrs



$\text{ZrO}_2\text{PCL}24\%$ a 24hrs

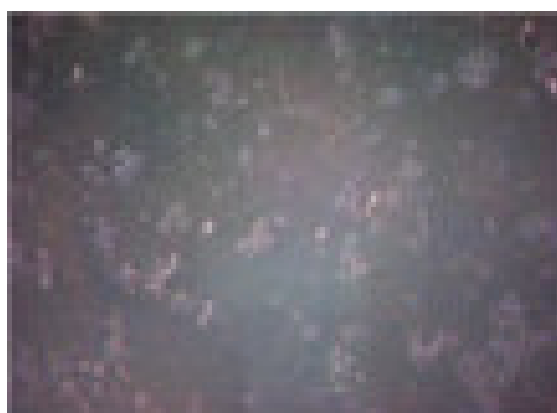


$\text{ZrO}_2\text{PCL}24\%$ a 72hrs

(a)



$\text{ZrO}_2\text{Y}_2\text{O}_3$ a 24hrs



$\text{ZrO}_2\text{Y}_2\text{O}_3$ a 72hrs



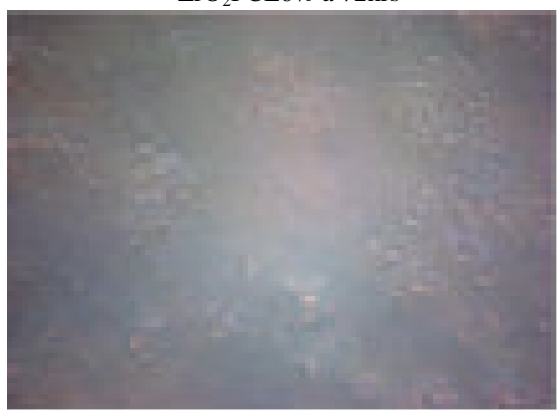
$\text{ZrO}_2\text{PCL}6\%$ a 24hrs



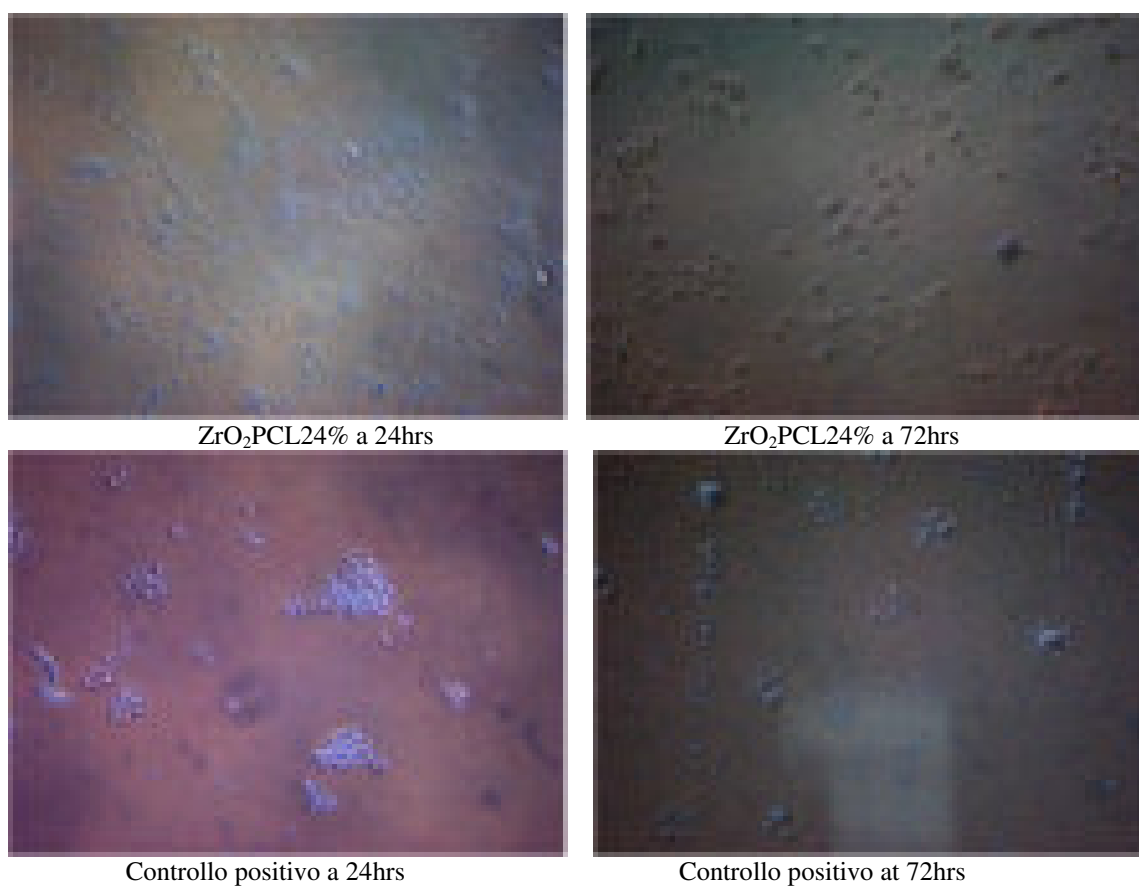
$\text{ZrO}_2\text{PCL}6\%$ a 72hrs



$\text{ZrO}_2\text{PCL}12\%$ a 24hrs



$\text{ZrO}_2\text{PCL}12\%$ a 72hrs



(b)

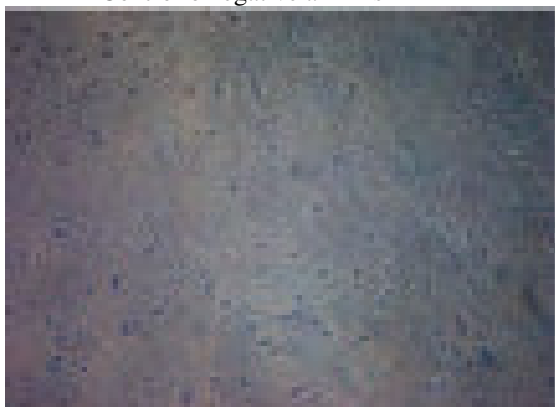
Fig. 4.6.2.9 Osservazioni al microscopio ottico (20X): (a) campioni sottoforma di dischi di ZrO₂YPCL(0, 6, 12 e 24wt%) a 24 e 72hrs; (b) campioni sottoforma di polveri, sterilizzati con radiazioni γ .



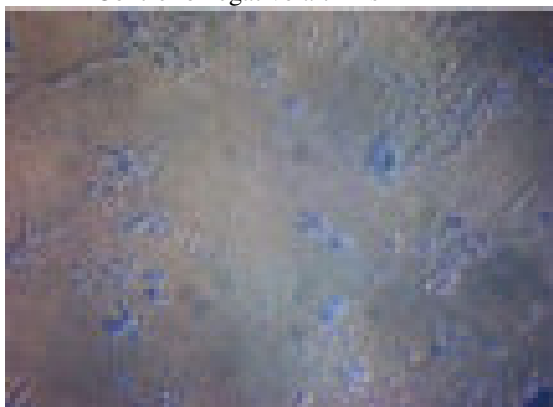
Controllo negativo a 24hrs



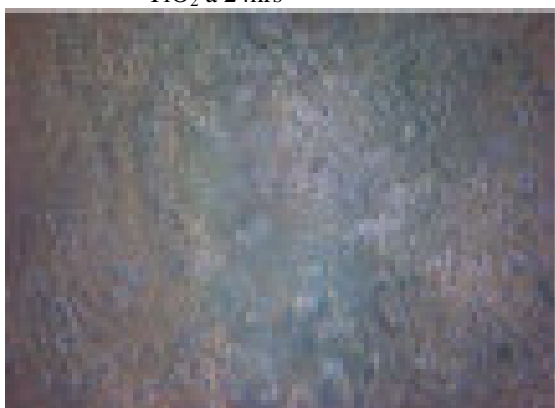
Controllo negativo a 72hrs



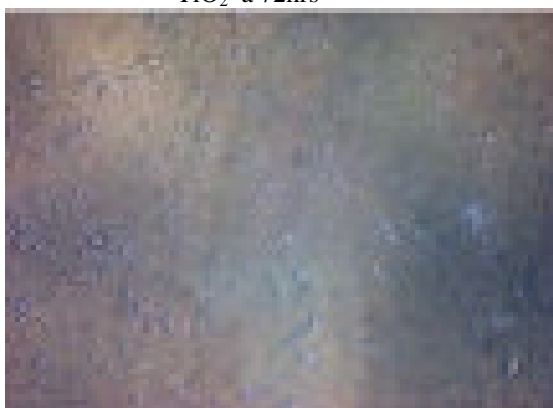
TiO₂ a 24hrs



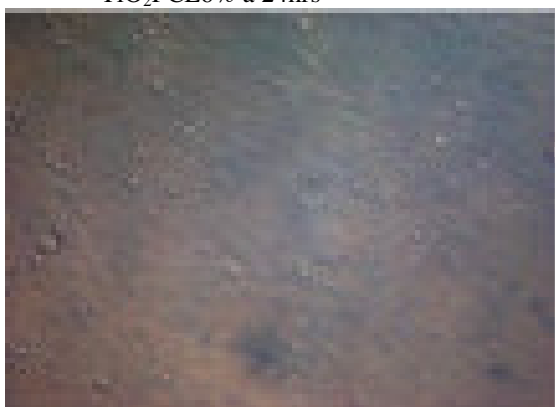
TiO₂ a 72hrs



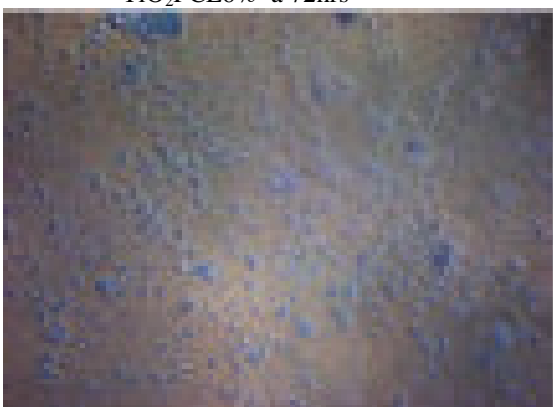
TiO₂PCL6% a 24hrs



TiO₂PCL6% a 72hrs



TiO₂PCL12% a 24hrs



TiO₂PCL12% a 72hrs



TiO₂PCL24% a 24hrs



TiO₂PCL24% a 72hrs

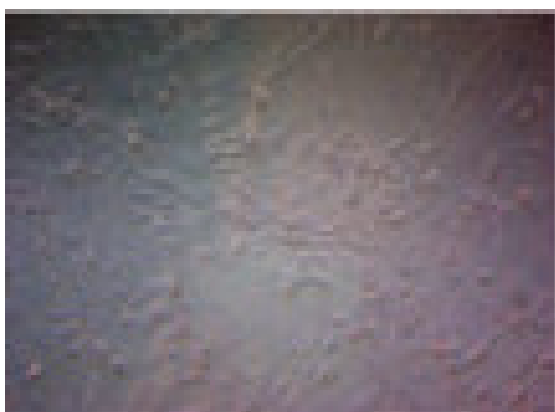
(a)



TiO₂ a 24hrs



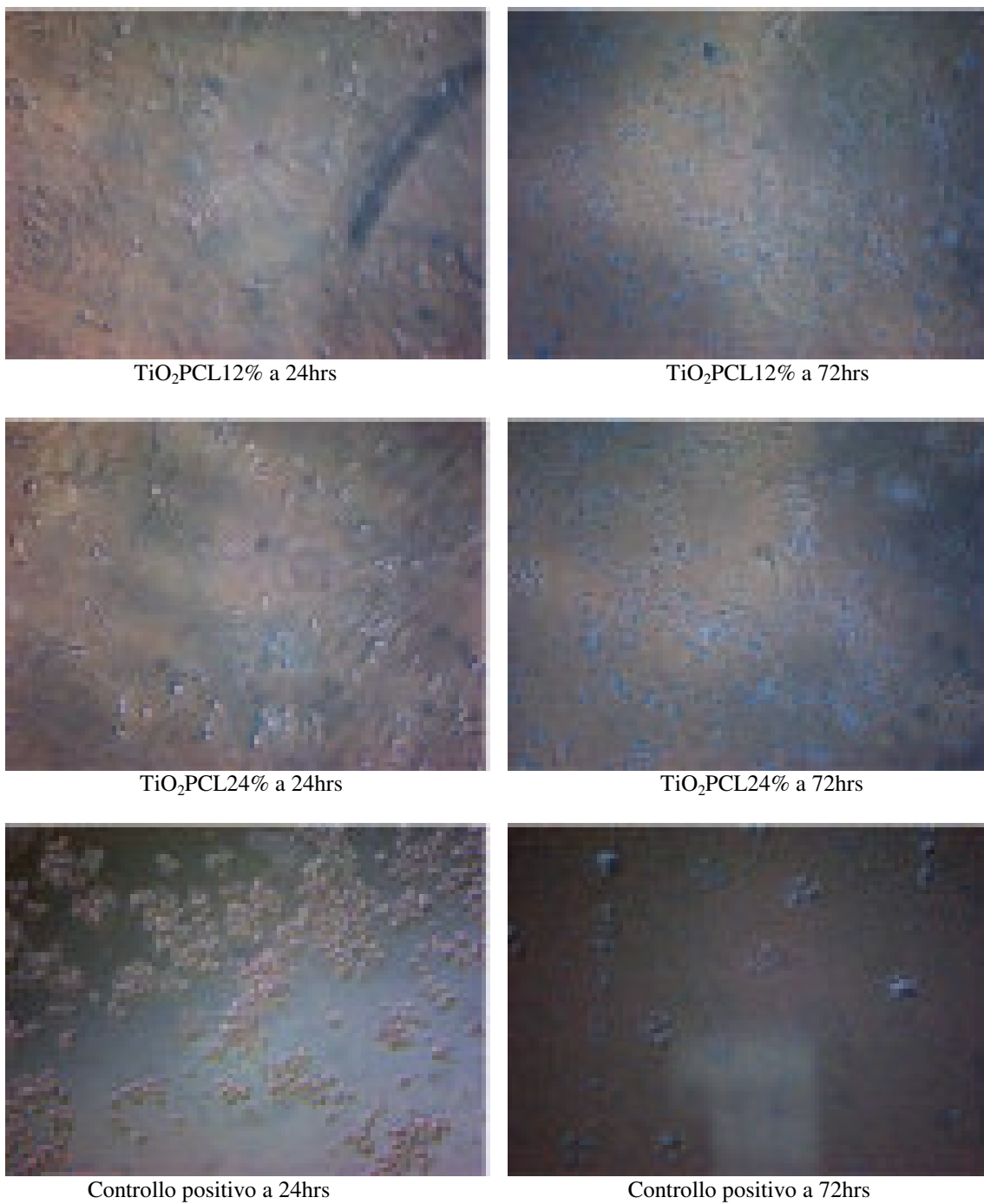
TiO₂ a 72hrs



TiO₂PCL6% a 24hrs



TiO₂PCL6% 72hrs



(b)

Fig. 4.6.2.10 Osservazioni al microscopio ottico (20X): (a) campioni sottoforma di dischi di TiO_2PCL (0, 6, 12 e 24wt%) a 24 e 72hrs; (b)campioni sottoforma di polveri, sterilizzati con radiazioni γ

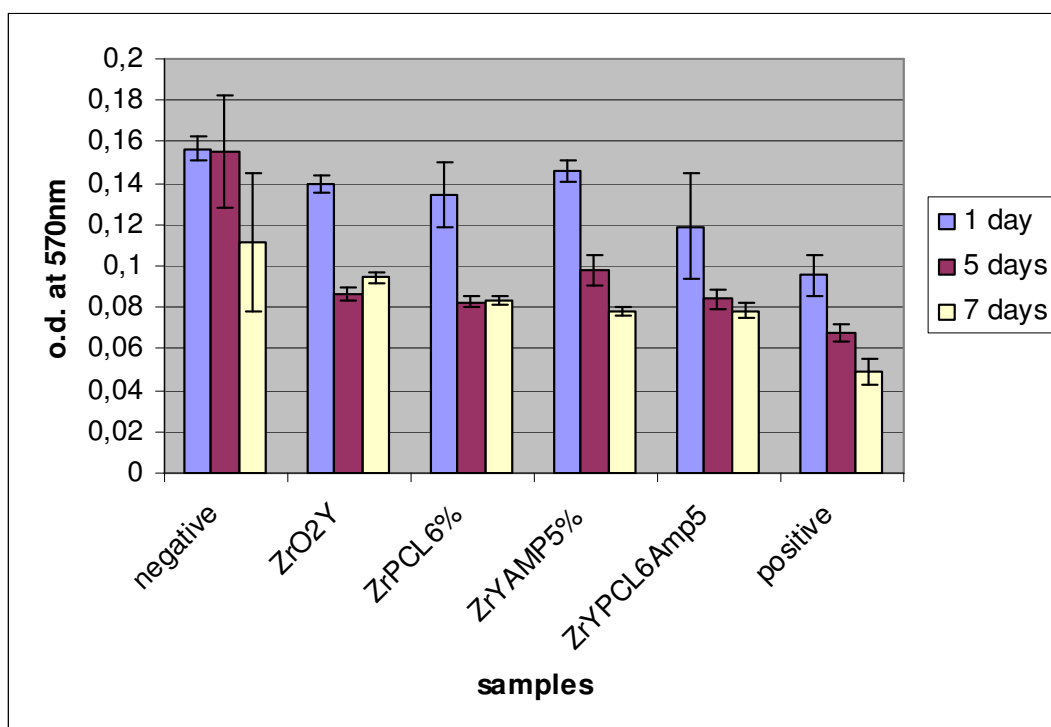
4.6.3 Alamar Blue test

Il test Alamar blue è un saggio diretto in cui viene messo il materiale a diretto contatto con le cellule e vederne poi gli effetti tramite lettura dell'assorbanza a 570nm. per questo test sono stati considerati solo i campioni $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+PCL(0 e 6wt\%)+Amp(0 e 5wt\%)}$ e $\text{TiO}_2\text{+PCL(0 e 6wt\%)+Amp(0 e 5wt\%)}$.

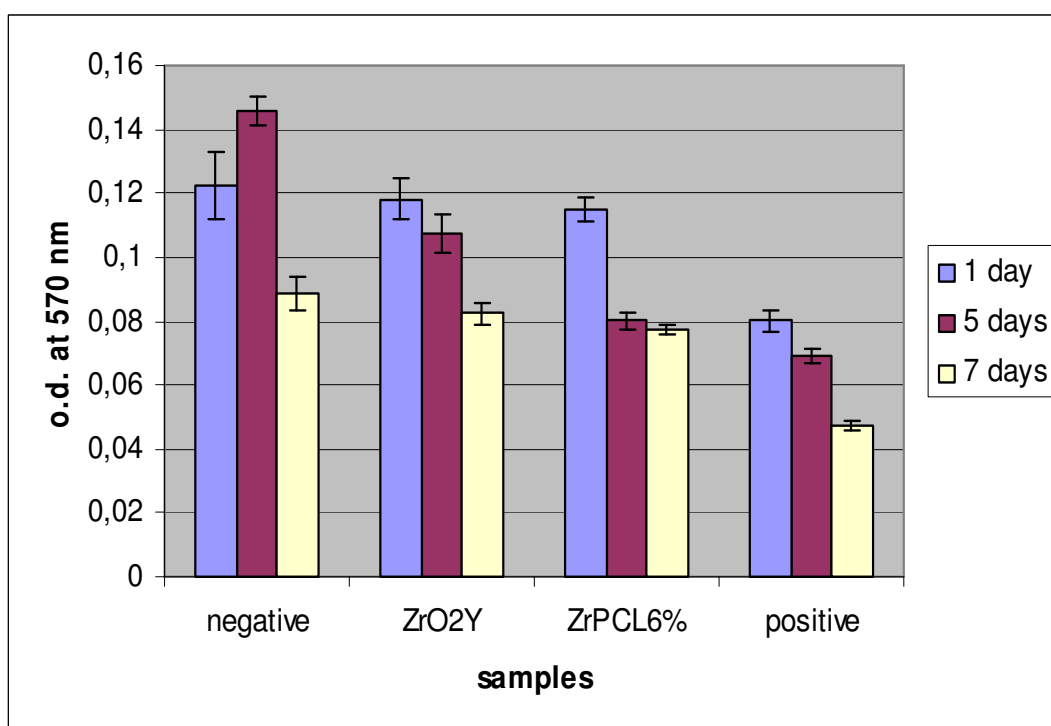
L'Alamar Blue è un indicatore redox che viene utilizzato per misurare qualitativamente la proliferazione cellulare. Come la crescita delle cellule HOBs in coltura, l'attività metabolica delle cellule (il saggio considera l'attività dell'enzima mitocondriale) mantiene l'ambiente ridotto nel circostante mezzo di coltura, mentre l'inibizione della crescita produce un ambiente ossidato. La riduzione causa un cambiamento di colore dell'indicatore Alamar blue da non-fluorescente (blue) a fluorescente (rosso), questa reazione può essere dedotta fluorometricamente o colorimetricamente. Il saggio Alamar blue offre il vantaggio che non è radioattivo e non tossico. Per questo test sono stati considerati i materiali sottoforma di dischi sterilizzati mediante autoclave e con radiazioni γ . A tal proposito è stato seguito il seguente protocollo:

- I campioni sono stati messi a contatto con $3,0 \cdot 10^4$ cellule osteoblastiche.
- Il controllo negativo è solo DMEM e cellule, mentre quello positivo consiste di dischetti di PVC con DMEM e cellule.
- Le piastre da 24 pozzetti così ottenute vengono poste in incubatore di CO_2 per tempi diversi: 1giorno, 5gg e 7gg.
- Dopo ciascun periodo di incubazione si rimuove il mezzo da ogni pozzetto e viene aggiunta la soluzione di Alamar blue. Le piastre vengono incubate per 4hrs.
- Dopo questo periodo di incubazione da ogni pozzetto vengono rimossi 100 μl di mezzo e posti in piastre da lettura (96 pozzetti).
- A questo punto è possibile effettuare la lettura dell'assorbanza a 570nm.
- I materiali restanti nelle piastre vengono lavati con PBS e aggiunto successivamente 1ml di DMEM per poter essere reincubati e utilizzati per continuare il test.

Dalla lettura dell'assorbanza abbiamo avuto i seguenti grafici dove si può osservare un inizio della crescita cellulare dopo le prime 24hrs per poi avere un andamento costante tra il 5° e il 7° giorno, questo sia per i materiali $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+PCL(0 e 6wt\%)+AMP(0 e 5wt\%)}$ (Fig.4.6.3.1) che per i materiali $\text{TiO}_2\text{+PCL(0 e 6wt\%)+AMP(0 e 5wt\%)}$ (Fig.4.6.3.2).

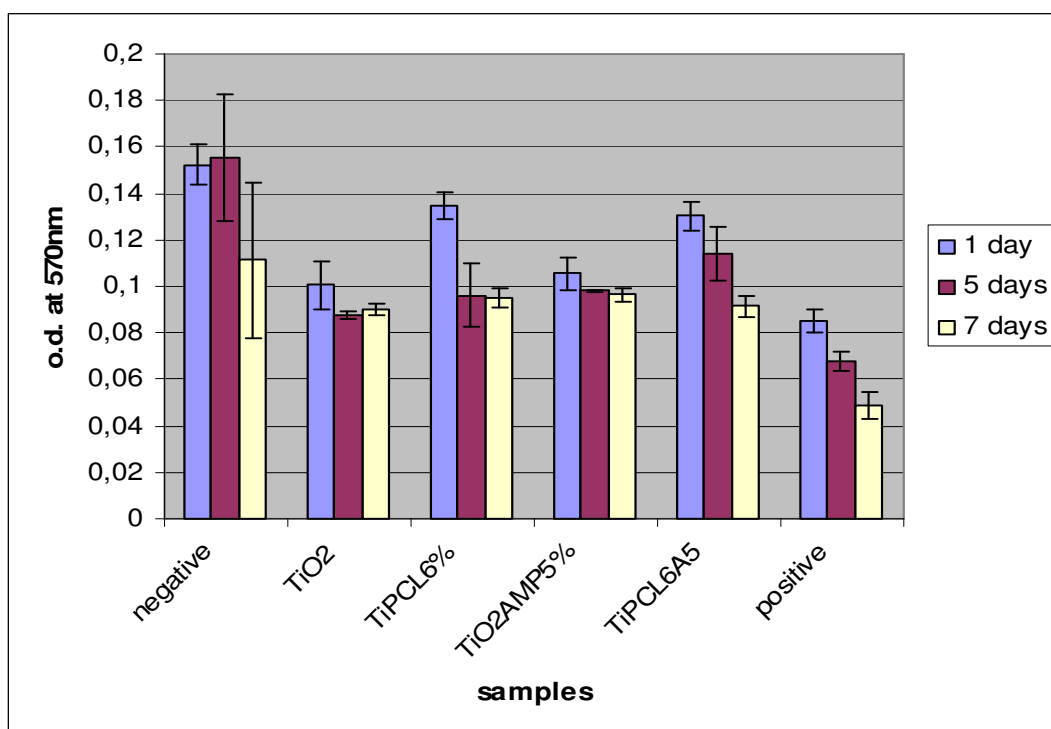


(a)

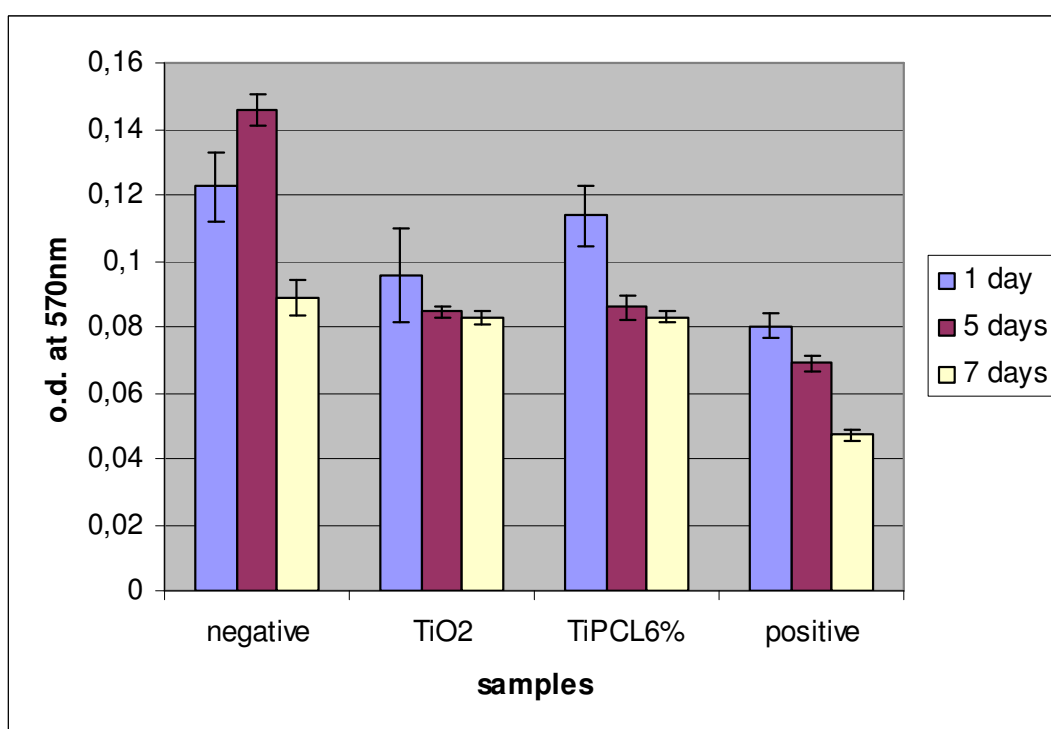


(b)

Fig. 4.6.3.1 Alamar Blue test campioni $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+PCL6wt\%+AMP(0 e 5wt\%)}$: (a) sterilizzati in autoclave (121°C per 20min): (b) sterilizzati con radiazioni γ



(a)

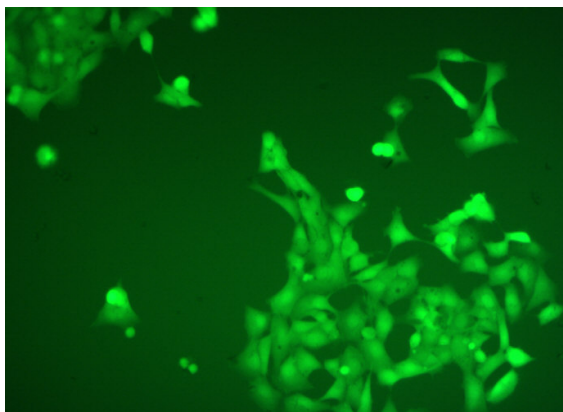


(b)

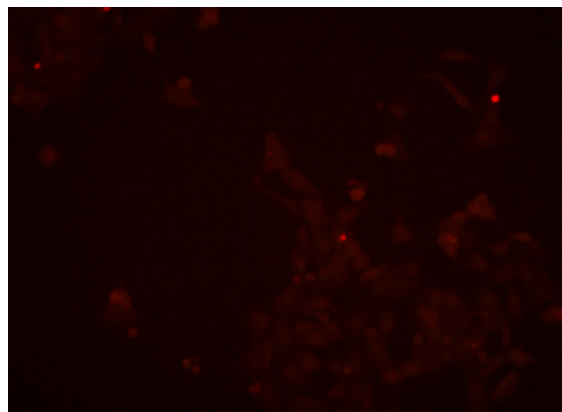
Fig. 4.6.3.2 Alamar Blue test campioni TiO₂+PCL6wt%+AMP(0 e 5wt%): (a) sterilizzati in autoclave (121 °C per 20min); (b) sterilizzati con radiazioni γ

4.6.4 Live/Dead Test

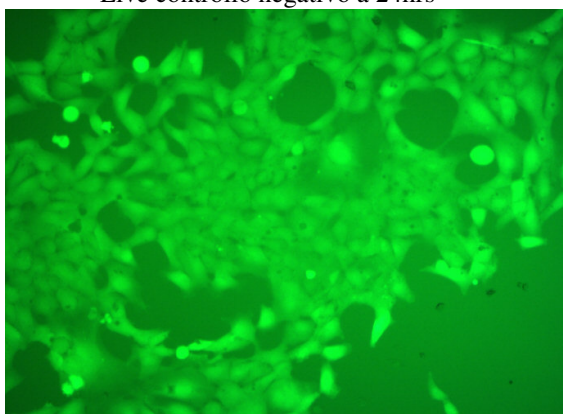
I materiali oggetto di studio sono stati sottoposti anche al live/dead test che ci permette di distinguere le cellule vive da quelle morte. Il test è stato fatto sull'eluato dopo 24 e 72hrs di contatto con il materiale, sottoforma di dischi, sterilizzato in autoclave. Per questo test è stato utilizzato un kit contenente 4mM di calcina in DMSO anidro e 2mM dell'omodimero etidio in una miscela di DMSO e H₂O. L'eluato è stato messo a contatto per 1h con 1µl di soluzione costituita da DMSO (privo di fenolo) e i componenti del kit. Dopo questo periodo di incubazione è possibile osservare al microscopio a fluorescenza le cellule che hanno continuato a proliferare dopo le 24 e 72hrs di contatto con il materiale. Le osservazioni al microscopio (Figs.4.6.4.1-4.6.4.2) rispecchiano i risultati ottenuti con MTT test, vale a dire che vi è maggiore mortalità cellulare sia per il campione $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+PCL24wt\%+Amp5wt\%}$ che per $\text{TiO}_2\text{+PCL24wt\%+Amp5wt\%}$.



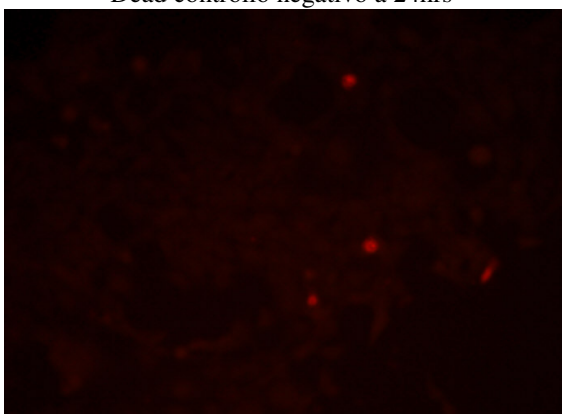
Live controllo negativo a 24hrs



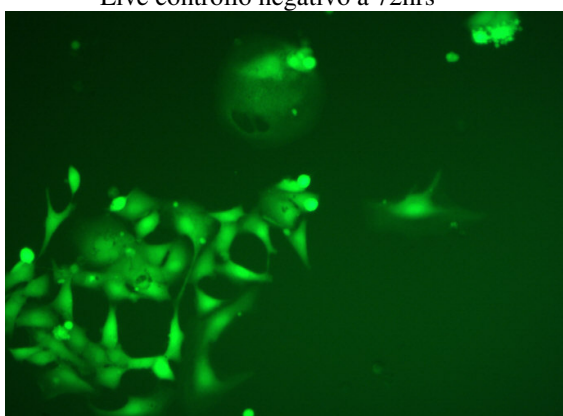
Dead controllo negativo a 24hrs



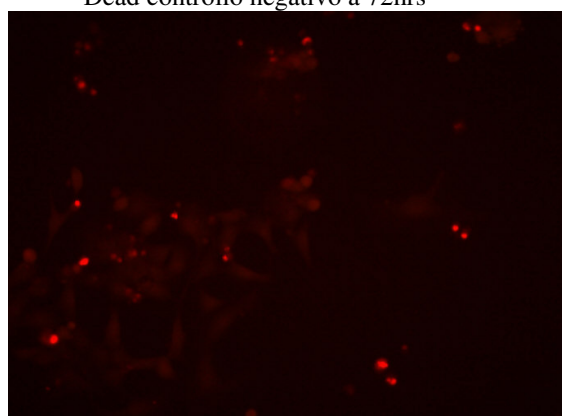
Live controllo negativo a 72hrs



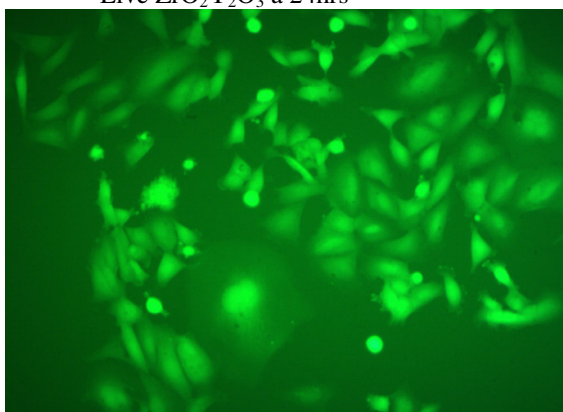
Dead controllo negativo a 72hrs



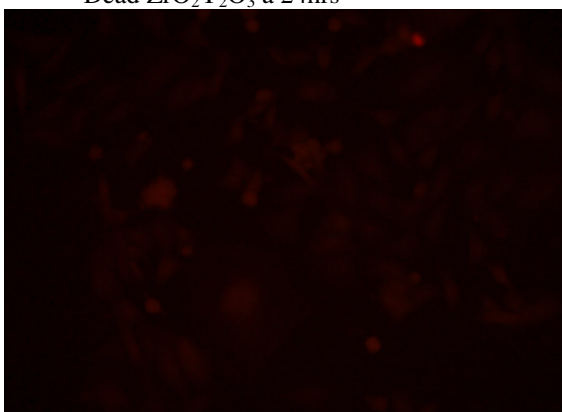
Live $\text{ZrO}_2\text{Y}_2\text{O}_3$ a 24hrs



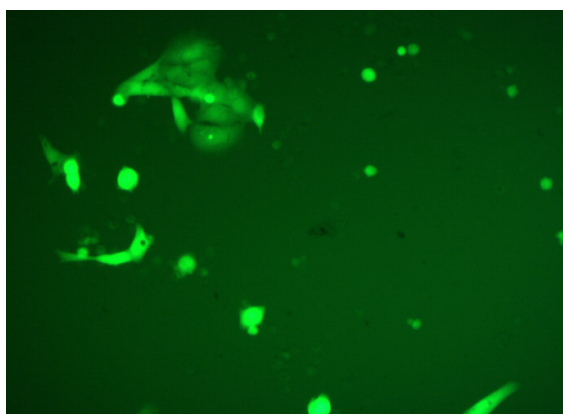
Dead $\text{ZrO}_2\text{Y}_2\text{O}_3$ a 24hrs



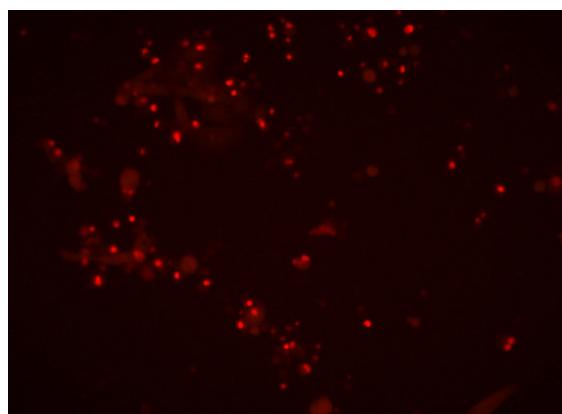
Live $\text{ZrO}_2\text{Y}_2\text{O}_3$ a 72hrs



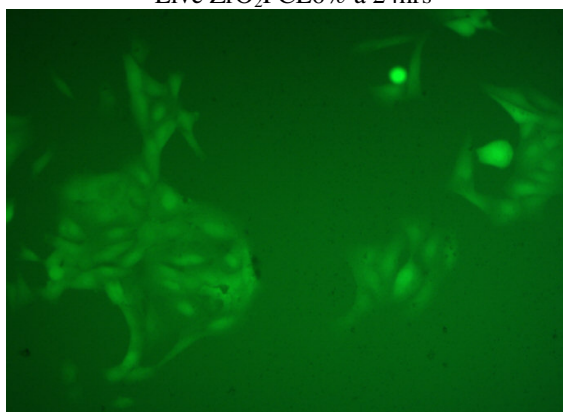
Dead $\text{ZrO}_2\text{Y}_2\text{O}_3$ a 72hrs



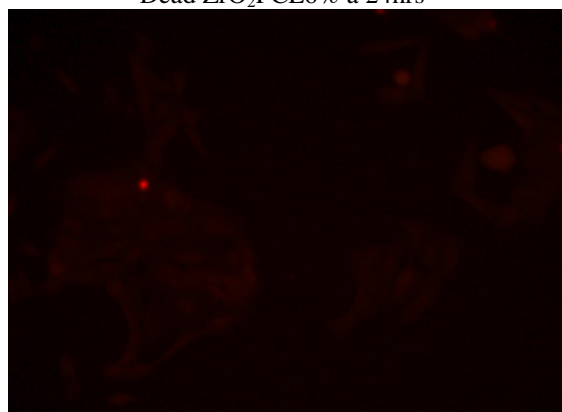
Live $\text{ZrO}_2\text{PCL6\%}$ a 24hrs



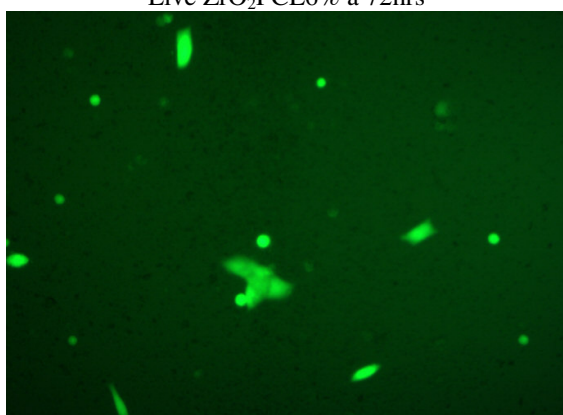
Dead $\text{ZrO}_2\text{PCL6\%}$ a 24hrs



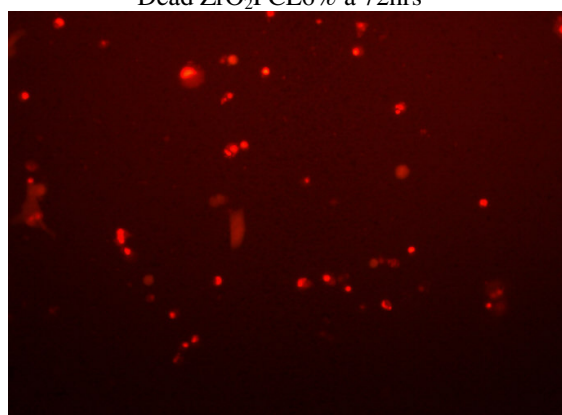
Live $\text{ZrO}_2\text{PCL6\%}$ a 72hrs



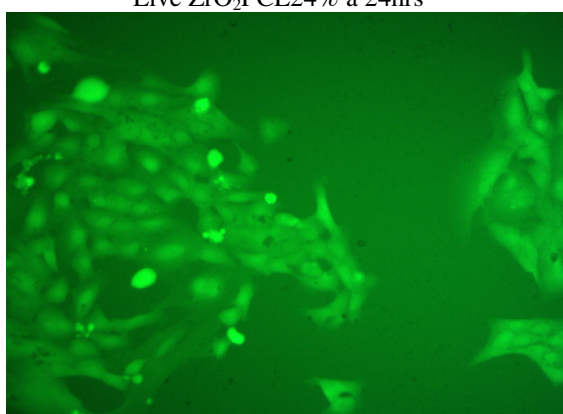
Dead $\text{ZrO}_2\text{PCL6\%}$ a 72hrs



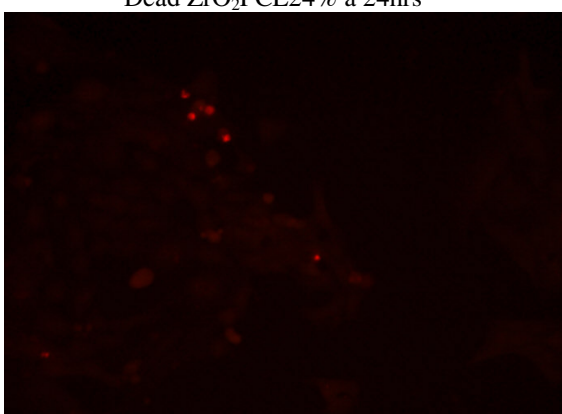
Live $\text{ZrO}_2\text{PCL24\%}$ a 24hrs



Dead $\text{ZrO}_2\text{PCL24\%}$ a 24hrs

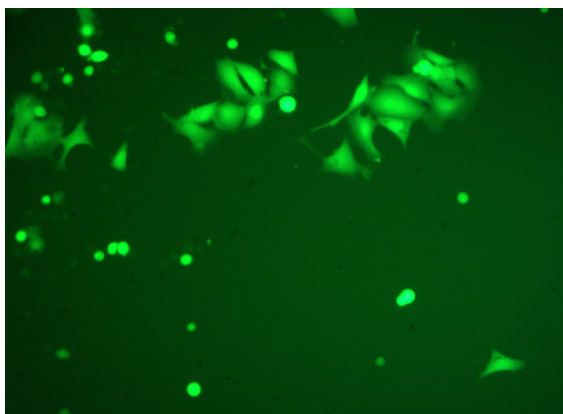


Live $\text{ZrO}_2\text{PCL24\%}$ a 72hrs

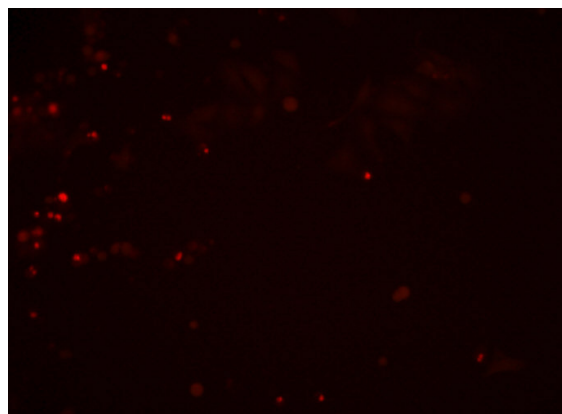


Dead $\text{ZrO}_2\text{PCL24\%}$ a 72hrs

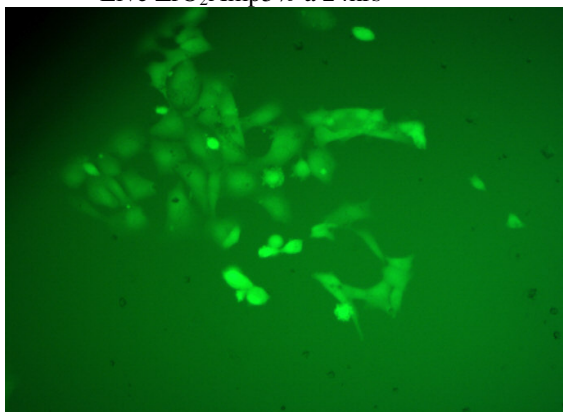
(a)



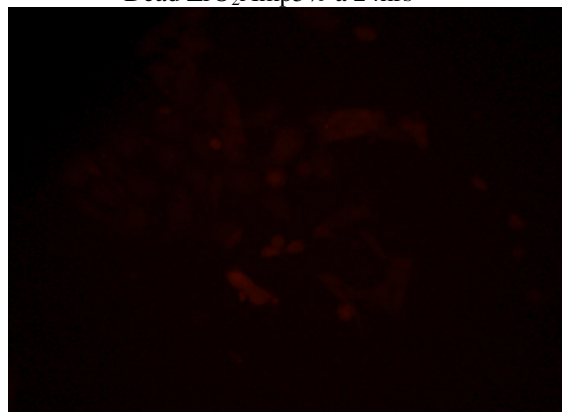
Live $\text{ZrO}_2\text{Amp5\%}$ a 24hrs



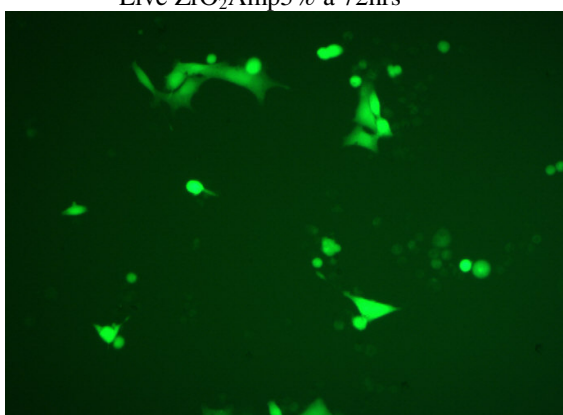
Dead $\text{ZrO}_2\text{Amp5\%}$ a 24hrs



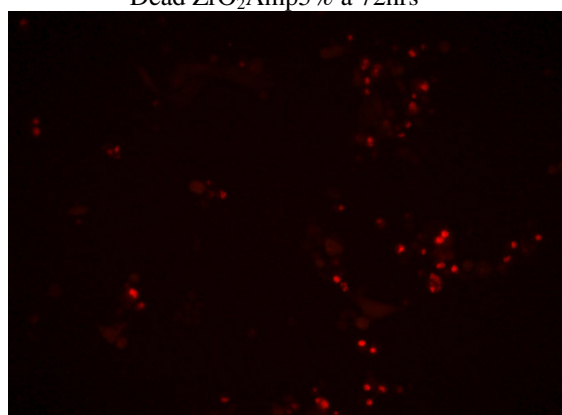
Live $\text{ZrO}_2\text{Amp5\%}$ a 72hrs



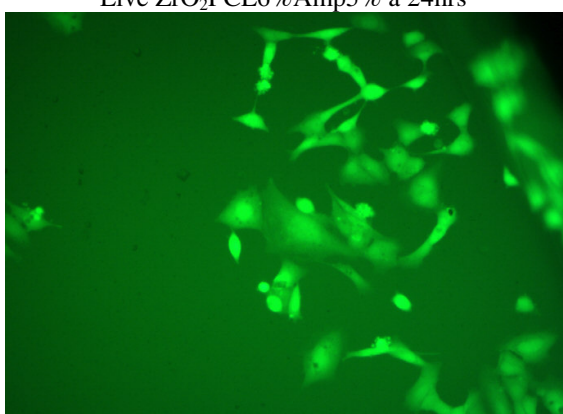
Dead $\text{ZrO}_2\text{Amp5\%}$ a 72hrs



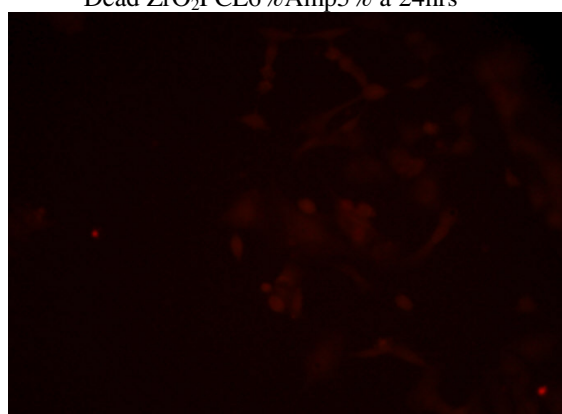
Live $\text{ZrO}_2\text{PCL6\%Amp5\%}$ a 24hrs



Dead $\text{ZrO}_2\text{PCL6\%Amp5\%}$ a 24hrs



Live $\text{ZrO}_2\text{PCL6\%Amp5\%}$ a 72hrs



Dead $\text{ZrO}_2\text{PCL6\%Amp5\%}$ a 72hrs

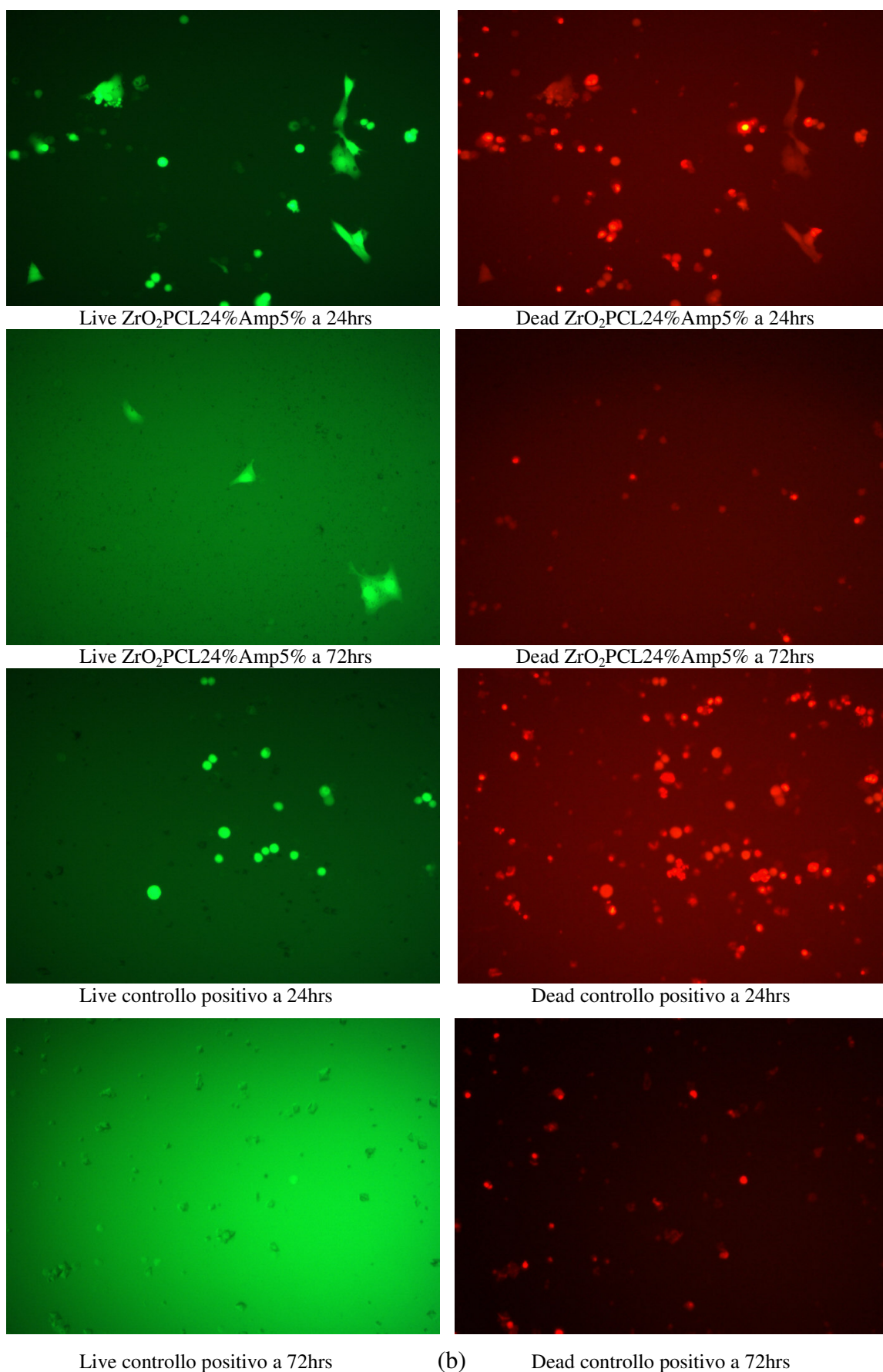
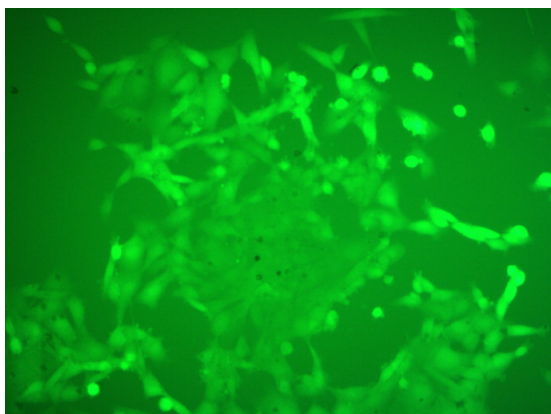
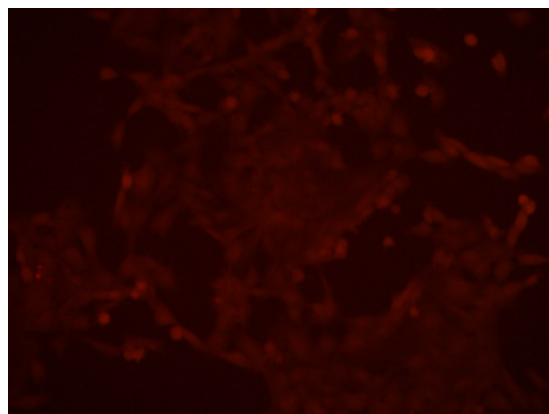


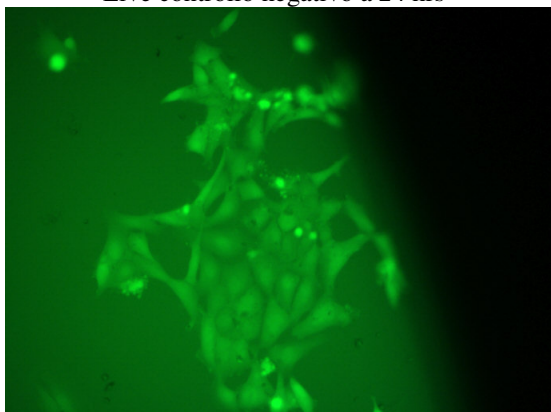
Fig. 4.6.4.1 Osservazioni al microscopio di: (a) ZrO₂5wt%Y₂O₃+PCL(0, 6 e 24wt%); (b)ZrO₂5wt%Y₂O₃+PCL(0, 6 e 24wt%)+Amp5wt% materiali sottoforma di dischi sterilizzati in autoclave.



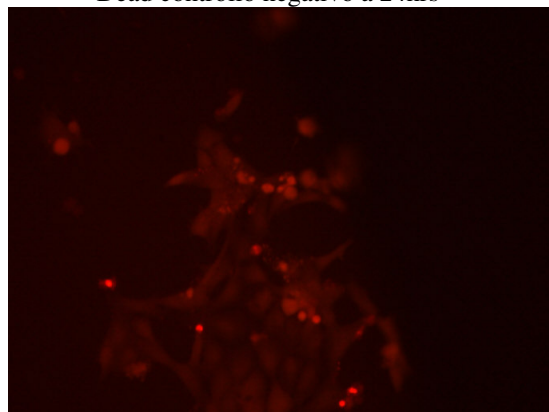
Live controllo negativo a 24 hrs



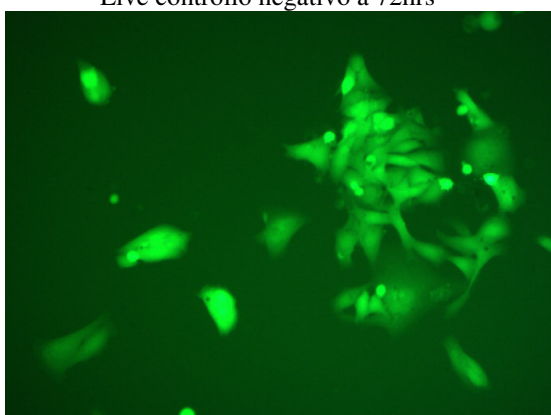
Dead controllo negativo a 24hrs



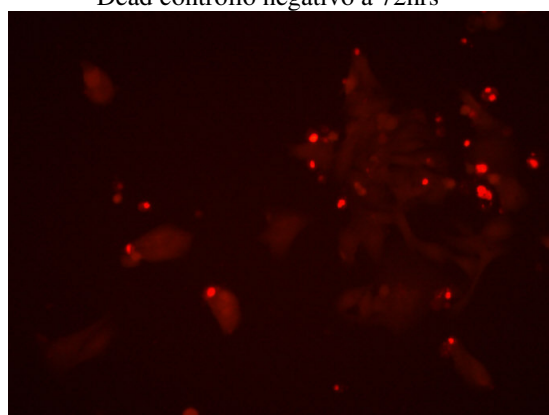
Live controllo negativo a 72hrs



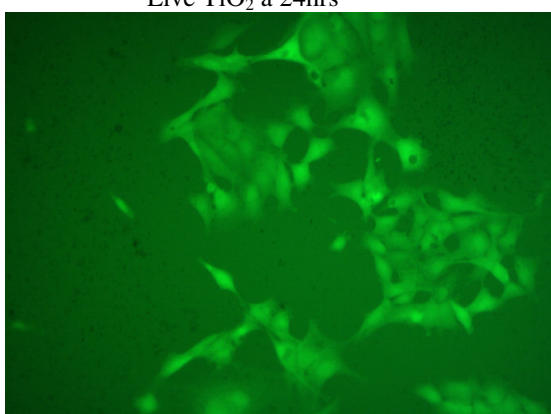
Dead controllo negativo a 72hrs



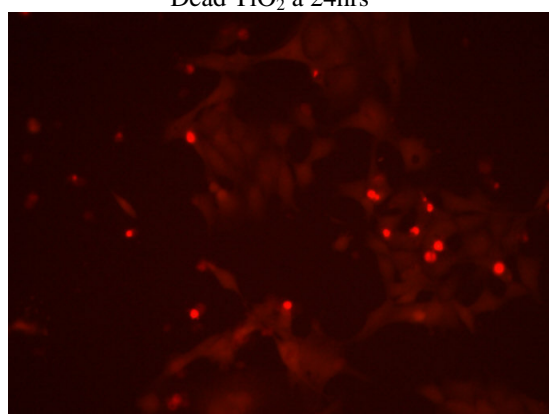
Live TiO₂ a 24hrs



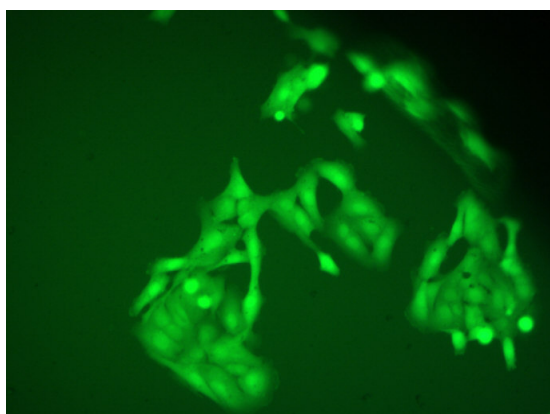
Dead TiO₂ a 24hrs



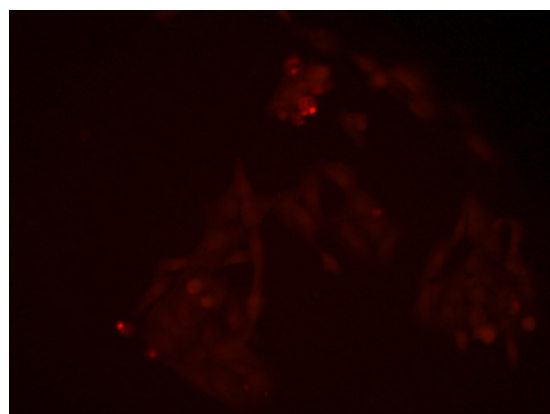
Live TiO₂ a 72hrs



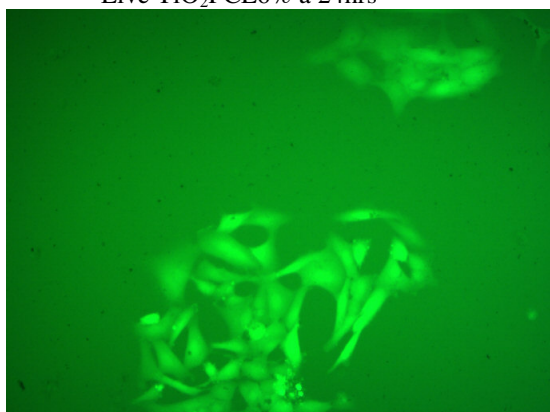
Dead TiO₂ a 72hrs



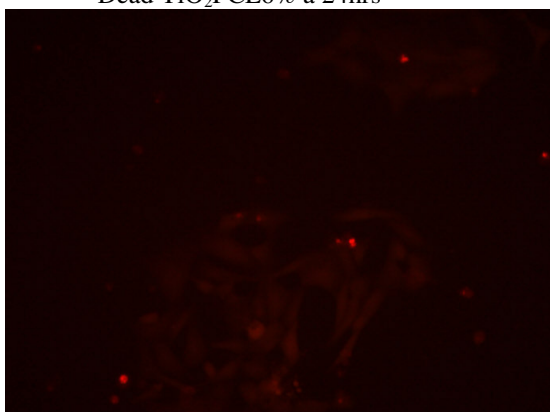
Live $\text{TiO}_2\text{PCL6\%}$ a 24hrs



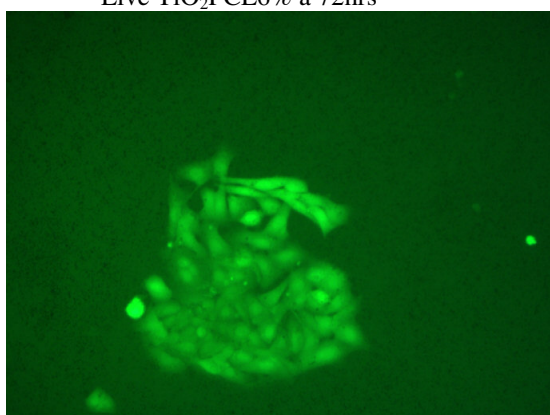
Dead $\text{TiO}_2\text{PCL6\%}$ a 24hrs



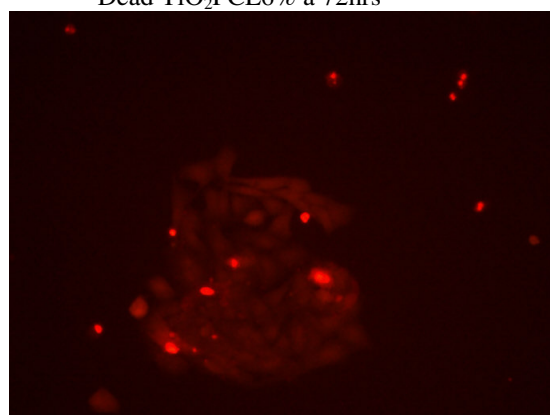
Live $\text{TiO}_2\text{PCL6\%}$ a 72hrs



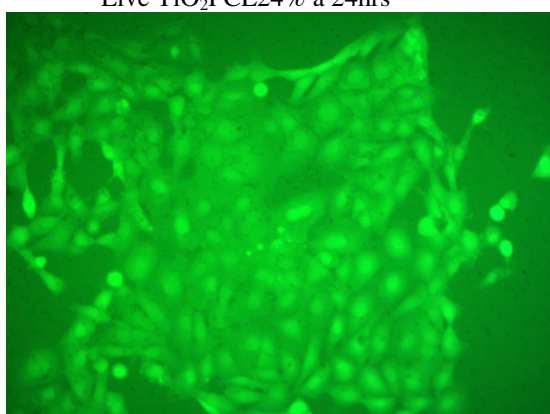
Dead $\text{TiO}_2\text{PCL6\%}$ a 72hrs



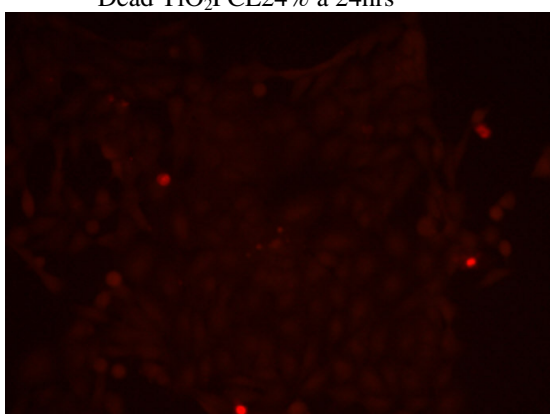
Live $\text{TiO}_2\text{PCL24\%}$ a 24hrs



Dead $\text{TiO}_2\text{PCL24\%}$ a 24hrs

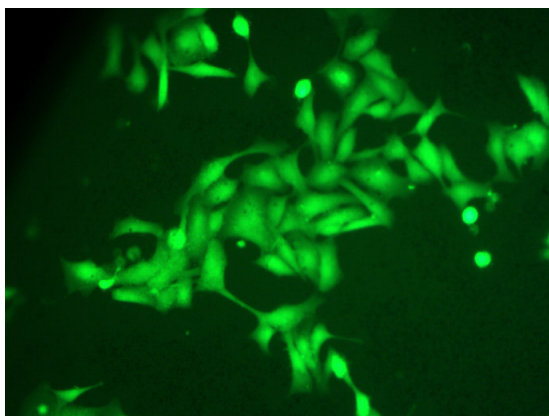


Live $\text{TiO}_2\text{PCL24\%}$ a 72hrs

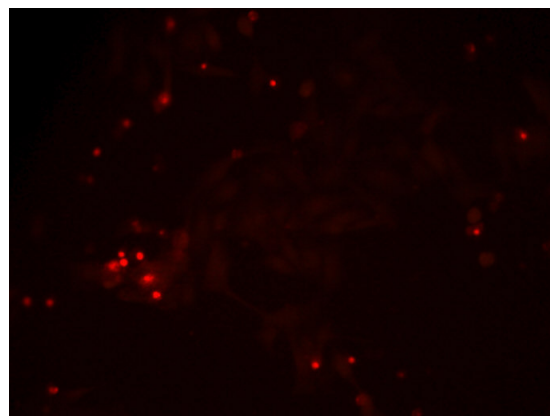


Dead $\text{TiO}_2\text{PCL24\%}$ a 72hrs

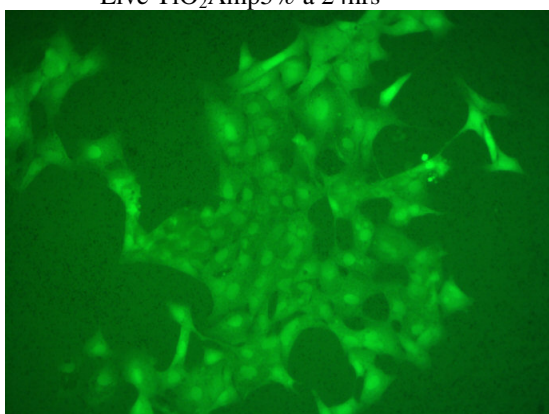
(a)



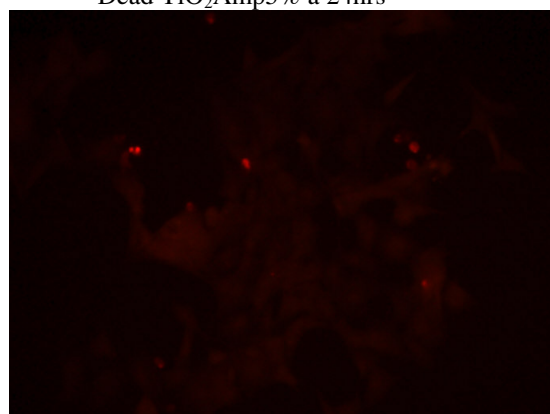
Live $\text{TiO}_2\text{Amp}5\%$ a 24hrs



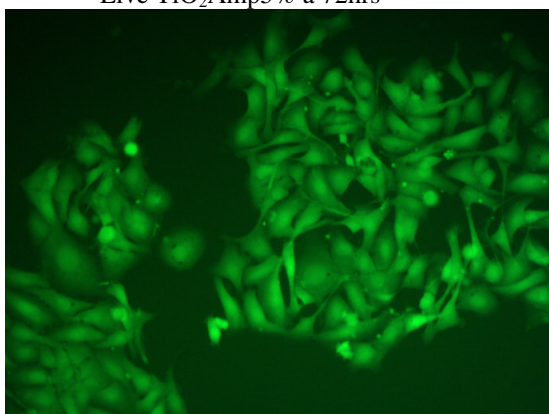
Dead $\text{TiO}_2\text{Amp}5\%$ a 24hrs



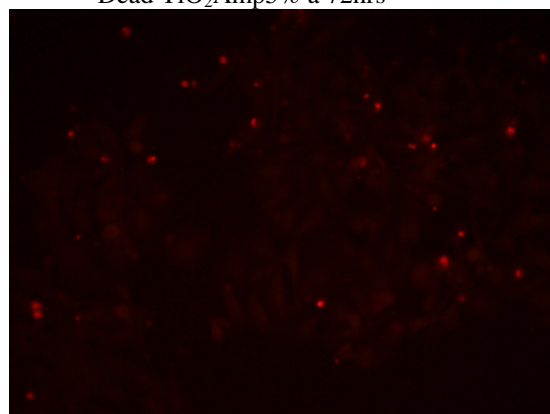
Live $\text{TiO}_2\text{Amp}5\%$ a 72hrs



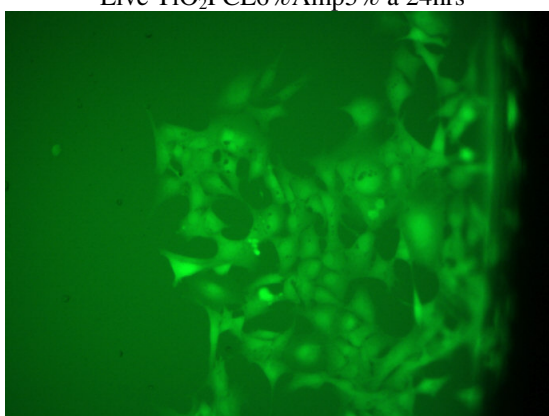
Dead $\text{TiO}_2\text{Amp}5\%$ a 72hrs



Live $\text{TiO}_2\text{PCL}6\%\text{Amp}5\%$ a 24hrs



Dead $\text{TiO}_2\text{PCL}6\%\text{Amp}5\%$ a 24hrs



Live $\text{TiO}_2\text{PCL}6\%\text{Amp}5\%$ a 72hrs



Dead $\text{TiO}_2\text{PCL}6\%\text{Amp}5\%$ a 72hrs

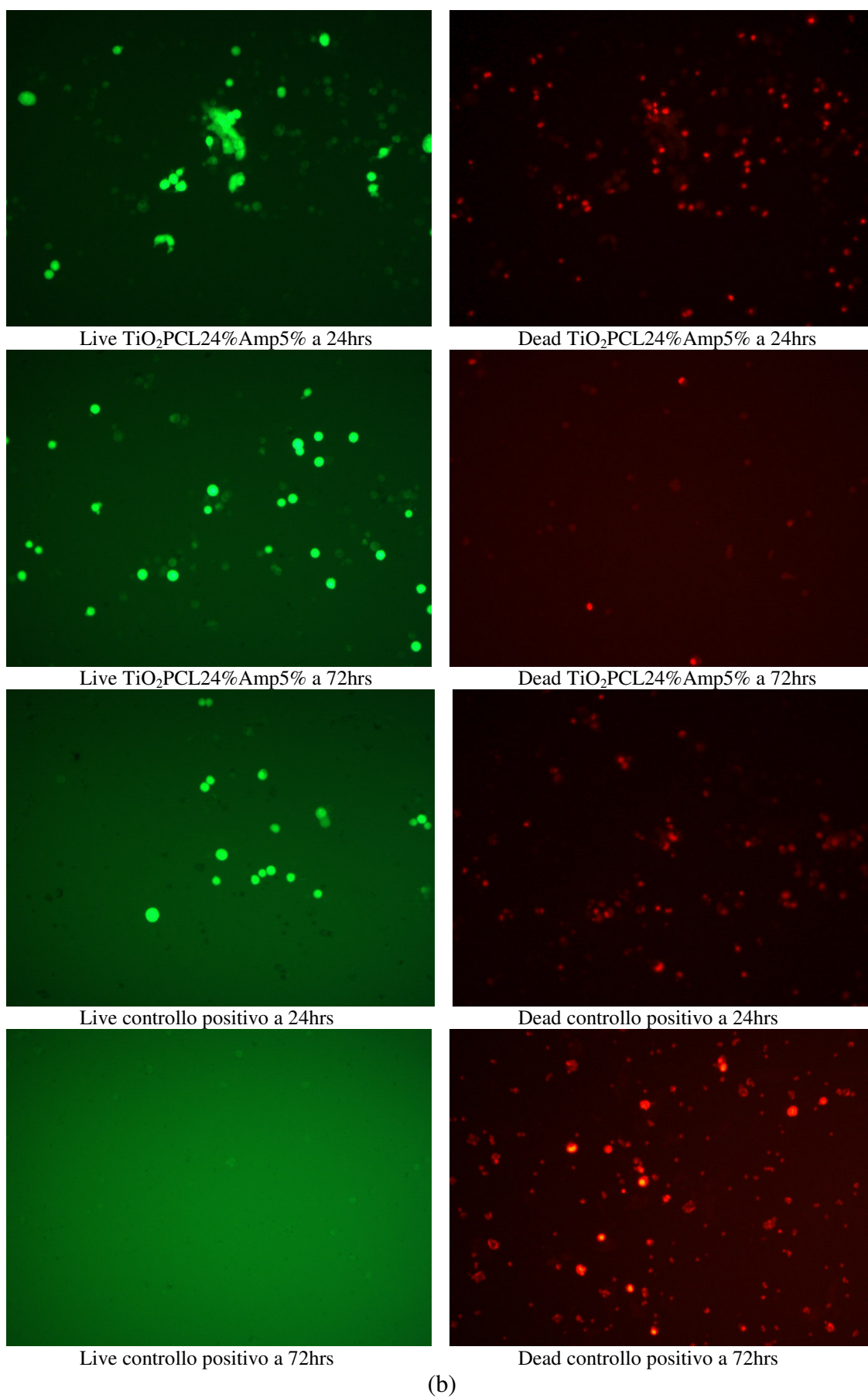


Fig. 4.6.4.2 Osservazioni al microscopio di: (a) $\text{TiO}_2+\text{PCL}(0,6 \text{ e } 24\text{wt}\%)$ a 24 e 72hrs; (b) $\text{TiO}_2+\text{PCL}(0, 6 \text{ e } 24\text{wt}\%)+\text{Amp}5\text{wt}\%$ a 24 e 72hrs materiali sottoforma di dischi sterilizzati in autoclave

4.7 Studio sul rilascio utilizzando Spettroscopia UV-VIS

La quantità di sodio ampicillina rilasciata è stata monitorata utilizzando la spettroscopia UV. Per stabilire una relazione tra l'assorbanza all'UV dell'ampicillina sodica a 197 nm e la concentrazione della stessa nella soluzione, è stata preparata una curva di calibrazione utilizzando una soluzione standard con range tra 0,1 e 1 mg di sodio ampicillina/ml. Le soluzioni standard sono preparate in acqua distillata.

Della curva di calibrazione si sceglie il tratto lineare che segue la legge di Lambert-Beer:

$$A = \varepsilon c l$$

Dove ε è il coefficiente di assorbanza, l è la lunghezza del cammino ottico e c è la concentrazione della soluzione .

La curva di calibrazione ottenuta in accordo alla legge di Lambert-Beer è descritta dalla seguente equazione:

$$A = 9.9602c - 0.0004$$

È stato trovato un fattore di correlazione di 0.9998. Tutti i valori della concentrazione sono basati su questa curva di calibrazione. È possibile dunque correlare l'assorbanza direttamente alla concentrazione di antibiotico presente nella soluzione Fig.4.7.1.

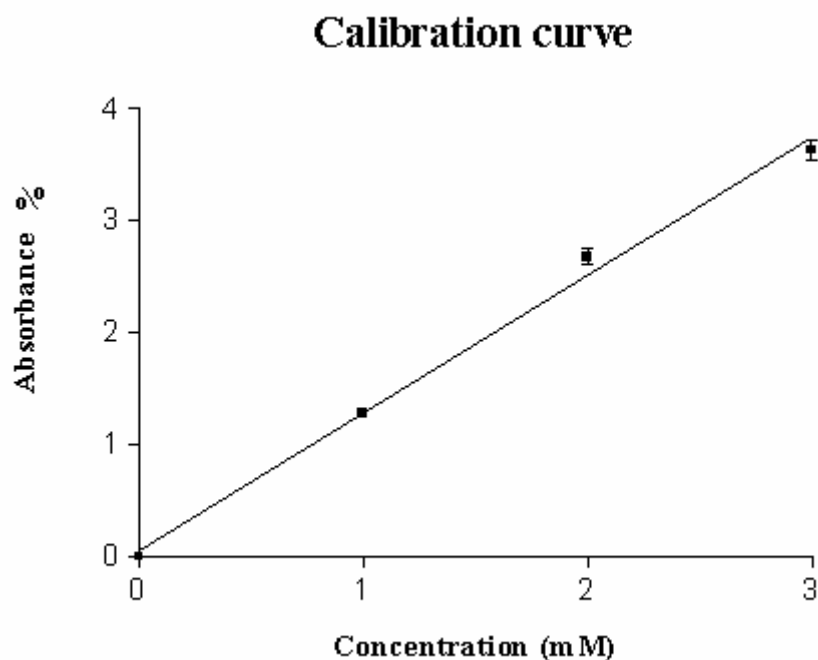


Fig. 4.7.1 Retta di taratura A(197 nm) in funzione della concentrazione di Ampicillina

Gli studi sul rilascio sono effettuati in acqua. La metodica prevede che una quantità fissa di campione (di circa 400mg) sia messa in una capsula di Petri, indi si aggiungono 15 ml di H₂O e si lascia in agitazione a 37°C. Si prelevano aliquote di 3.5 ml per effettuare le misure allo spettrofotometro a tempo zero e ogni 10' fino a diminuire il valore della assorbanza. In grafico si riportano i valori della concentrazione dell'ampicillina rilasciata dal campione in acqua in funzione del tempo di rilascio (in ore). Dalla Fig.4.7.2 si può osservare che il rilascio di ampicillina da ZrO₂-5wt%Y₂O₃ si completa in 60hrs, inoltre nella Fig.4.7.3 viene riportato il grafico della velocità di rilascio in funzione del tempo.

E' stato inoltre studiato il rilascio di ampicillina dal sistema ZrO₂-5wt%Y₂O₃+PCL6%, dove si osserva che l'ammontare di ampicillina è stata rilasciata in modo relativamente veloce durante le prime 6hrs per essere completato entro le 180hrs (circa 7 gg), mentre il rilascio di ampicillina da ZrO₂-5wt%Y₂O₃+PCL12%, è più lento del ZrO₂-5wt%Y₂O₃+PCL6%, durante le prime 6hrs, per completarsi entro le 200hrs (circa 8 gg). Come si può osservare, non c'è molta differenza nel tempo di rilascio. Per ZrO₂-5wt%Y₂O₃+PCL24%, il rilascio di antibiotico entro le 6hrs è più lento dei precedenti. Un comportamento analogo lo si osserva anche per i materiali a base di TiO₂ (Figs.4.7.4-4.7.5). La differenza

osservata nel comportamento di rilascio dai nostri campioni potrebbe essere attribuita ai differenti network dei tre geli che sono determinati dal diverso contenuto in peso del PCL. Le due fasi di rilascio osservate in tutti i casi suggeriscono che la fase iniziale di rilascio è dovuta alla dissoluzione e diffusione dell'ampicillina presente sulla superficie del campione. La seconda e più lenta fase coinvolge l'ampicillina incorporata nei cluster interni. Un'osservazione interessante è la generale presenza di un lento periodo, il quale è indicativo della necessità di penetrazione del solvente nella struttura.

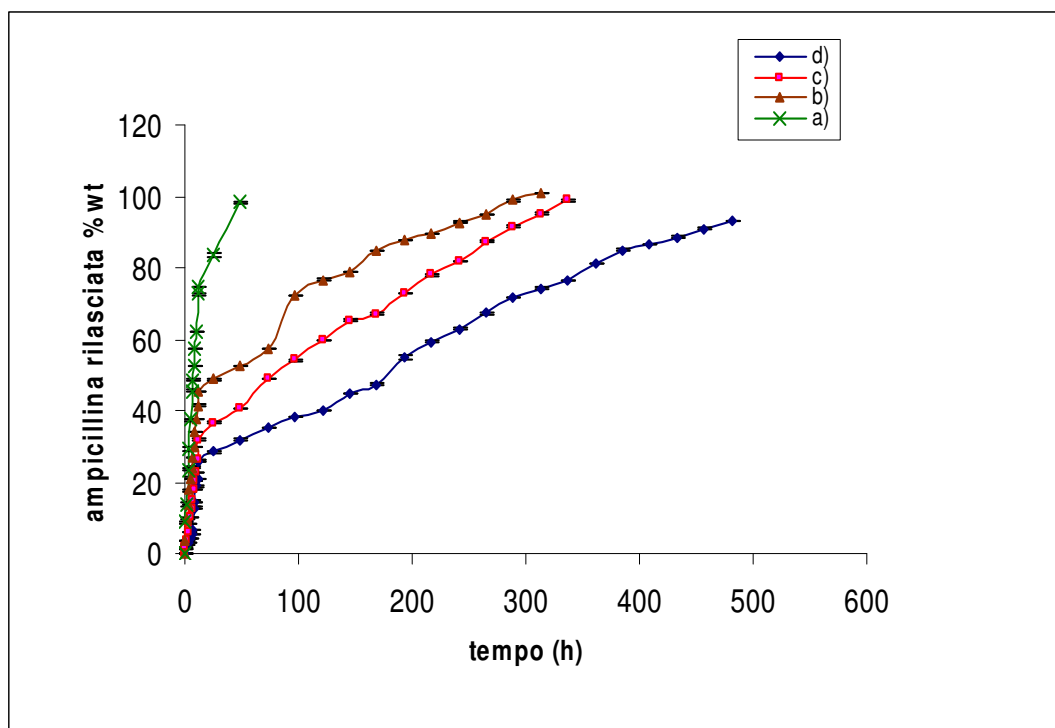


Fig.4.7.2 Rilascio in H₂O di antibiotico da: a)ZrO₂-5wt%Y₂O₃+Amp5wt%; b)ZrO₂-5wt%Y₂O₃PCL6wt%+Amp5wt%;c)ZrO₂-5wt%Y₂O₃PCL12wt%+Amp5wt%; d)ZrO₂-5wt%Y₂O₃PCL24wt%+Amp5wt%

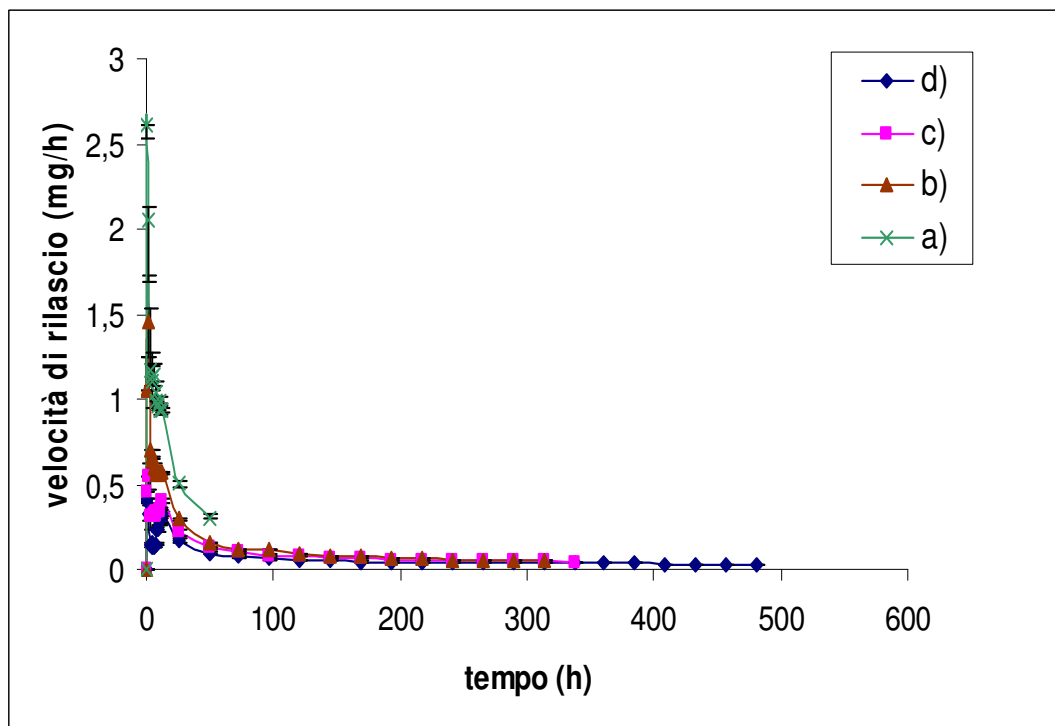


Fig.4.7.3 Velocità di rilascio(mg/h) in H₂O di antibiotico da: a)ZrO₂-5wt%Y₂O₃+Amp5wt%;b)ZrO₂5wt%Y₂O₃PCL6wt%+Amp5wt%;c)ZrO₂Y₂O₃PCL12wt%+Amp5wt %;d)ZrO₂-5wt%Y₂O₃PCL24wt%+Amp5wt%.

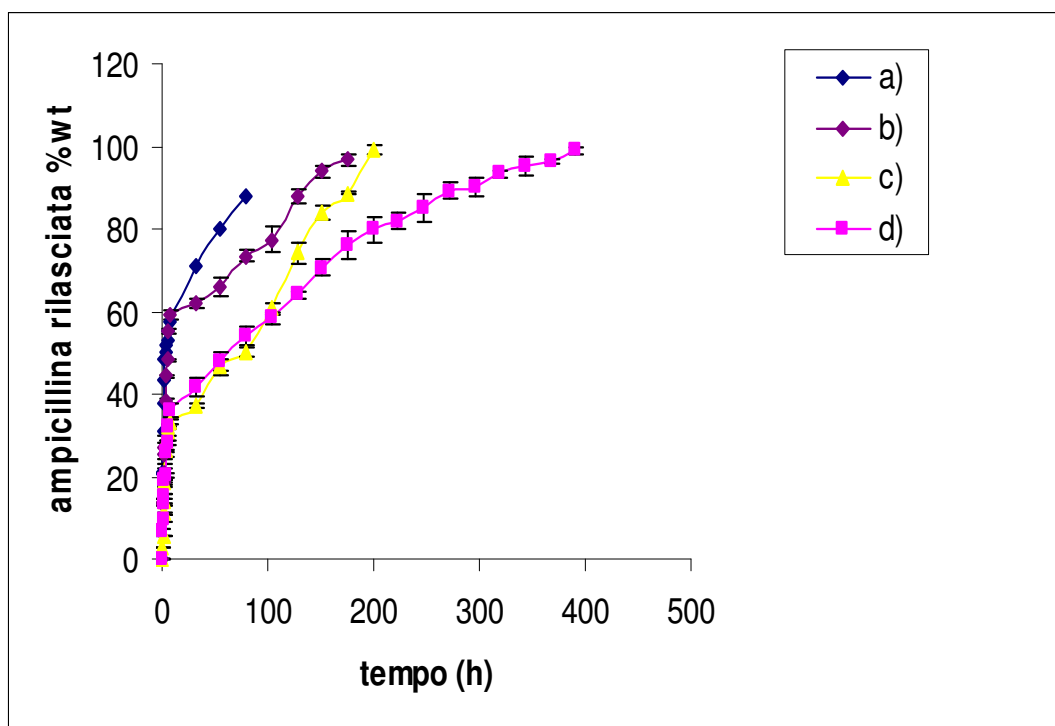


Fig.4.7.4 Rilascio in H₂O di antibiotico da: a) TiO₂+Amp5%; b) TiO₂PCL6%+Amp5%; c) TiO₂PCL12%+Amp5%; d) TiO₂PCL24%+Amp5%

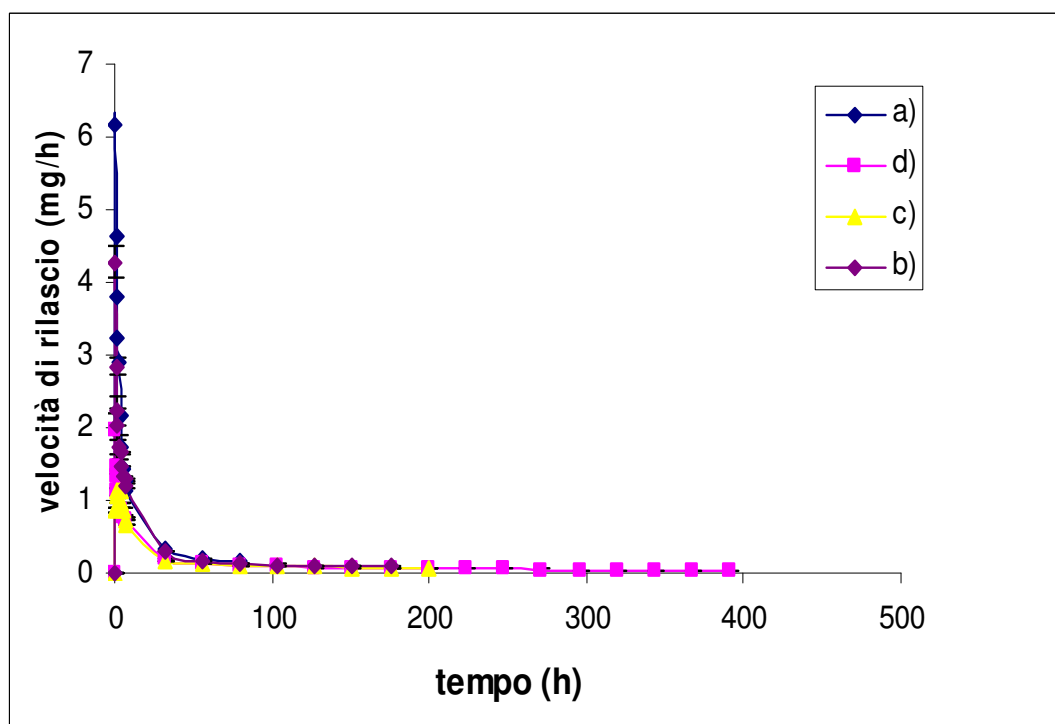


Fig.4.7.5 Velocità di rilascio (mg/h) in H₂O di antibiotico da: a) TiO₂+Amp5%; b) TiO₂PCL6%+Amp5%; c) TiO₂PCL12%+Amp5%; d) TiO₂PCL24%+Amp5%

CONCLUSIONI

Sono stati sintetizzati materiali ibridi organo-inorganici aventi composizione $\text{ZrO}_2\text{-5wt\%Y}_2\text{O}_3\text{+PCL}$ (6%, 12% e 24% in peso) e $\text{TiO}_2\text{+PCL}$ (6%, 12% e 24% in peso) in cui è stata incorporata Ampicillina al 5% in peso. Per la sintesi di tali materiali è stata utilizzata la tecnica sol-gel. La caratterizzazione chimica di tali materiali è stata fatta mediante diverse tecniche strumentali, quali: XRD, FTIR, SEM, AFM.

Dall'analisi XRD possiamo dedurre che i materiali studiati sono amorfi. Il confronto dei diffrattogrammi amorfi degli ibridi con quello cristallino relativo al policaprolattone ci permette di ipotizzare la formazione di un nuovo materiale amorfo. Le indagini FTIR mostrano i picchi caratteristici dei vari gruppi funzionali ed il tipo di legame instauratosi tra la fase organica e quella inorganica. Si tratta di un legame ad idrogeno tra l'ossigeno carbonilico del polimero (fase organica) e l'idrogeno dei gruppi OH presenti sulla catena inorganica in crescita secondo gli stadi previsti dal metodo sol-gel.

Le indagini all'AFM e al SEM dei campioni dimostrano che i sistemi sintetizzati possono essere considerati dei materiali ibridi organo-inorganici omogenei, perché le distanze medie tra i domini sono minori di 400 nm. Sono stati inoltre effettuati test di bioattività su tutti i sistemi preparati. Dai risultati ottenuti è emerso che tali materiali sono bioattivi, in quanto dall'analisi al SEM con relativa microanalisi si osserva la presenza di picchi del calcio e del fosforo caratteristici dell'idrossiapatite depositata sulla superficie dei materiali, e il contenuto di idrossiapatite aumenta in modo dipendente dal contenuto di PCL. Sui materiali oggetto di studio sono stati fatti tests di biocompatibilità, come quello a contatto indiretto (MTT test) dove si è osservato che i materiali non interferiscono negativamente sulla proliferazione cellulare, anzi si è constatato che le cellule rimaste a contatto con i materiali per 72hrs abbiano seguito il normale ciclo di duplicazione; questo lo si può osservare dalle immagini al microscopio ottico. Con MTT test è stato valutato che i materiali sotto forma di polveri hanno un andamento della crescita cellulare migliore rispetto a quelli sotto forma di dischi, questo probabilmente è dovuto al fatto che per le polveri la superficie di contatto è maggiore e quindi la cellula può aderire meglio. Inoltre, tra i materiali sterilizzati con radiazioni γ e quelli in autoclave, quest'ultimi danno risultati migliori ciò probabilmente è dovuto al fatto che le radiazioni γ comportano alterazione strutturale sui materiali oggetto di studio; si può concludere che il modo

migliore di sterilizzare questi materiali ibridi è quello in autoclave. Sulla base di tali risultati è stato fatto il test a contatto diretto (Alamar Blue) solo per i campioni $\text{ZrO}_2\text{Y}_2\text{O}_3+\text{PCL}(0 \text{ e } 6\text{wt}\%)+\text{Amp}(0 \text{ e } 5\text{wt}\%)$ e $\text{TiO}_2+\text{PCL}(0 \text{ e } 6\text{wt}\%)+\text{Amp}(0 \text{ e } 5\text{wt}\%)$ sterilizzati in autoclave e con radiazioni γ per i quali è stato riscontrato che i materiali possono essere considerati biocompatibili. Oltre a questi tests, un'ulteriore analisi è stata live/dead test, si tratta di un'analisi morfologica, effettuata con microscopio ottico a fluorescenza, attraverso cui è possibile distinguere in un'area ben delimitata le cellule vive (verde) da quelle morte (rosso). Questo test riconferma i risultati ottenuti con i tests precedenti: vale a dire che i materiali non inibiscono la crescita cellulare, tranne per quelli al 24wt% di PCL con ampicillina 5wt%, infatti si può osservare che la maggior parte delle cellule sono morte. Una spiegazione può essere data dal fatto che i materiali al 24wt% di PCL presentano un rilascio più lento e prolungato di conseguenza, anche se i materiali sono stati preventivamente lavati con esano e PBS, solo una piccola parte di antibiotico è stata persa nel mezzo mentre la maggior parte sarà rilasciata nella coltura, che si troverà in un ambiente saturo di antibiotico. Questo non accade con i materiali a più basso contenuto di polimero in quanto hanno un rilascio più veloce, in accordo con lo studio della cinetica di rilascio, e quindi la maggior parte del principio attivo è stata persa durante il lavaggio, quindi la cellula non subisce l'aggressione in una eccessiva concentrazione di principio attivo.

Lo studio della cinetica di rilascio dei materiali effettuata mediante Spettroscopia UV-VIS, ha portato alla conclusione che aumentando il contenuto di polimero aumenta il tempo di rilascio dell'antibiotico dando quindi un rilascio più prolungato, ciò è dovuto ai differenti network dei tre geli, nei quali la complessità morfologica aumenta di pari passo alla quantità di polimero.

L'idea di cercare biomateriali che possono rilasciare farmaci in maniera locale e controllata e nello stesso tempo essere bioattivi e biocompatibili è molto interessante. Questi biomateriali potrebbero prevenire infezioni e nello stesso tempo assicurare l'integrazione e la rigenerazione ossea. I risultati ottenuti costituiscono un'ottima base per uno sviluppo futuro del lavoro che potrebbe consistere nell'approfondimento del lato ingegneristico dello stesso, al fine di stabilire in maniera definitiva il probabile uso di tali materiali in implantologia creando quindi dei materiali liberamente impiantabili in cavie di laboratorio e quindi a seguito nell'uomo.

APPENDICE

TECNICHE STRUMENTALI UTILIZZATE

A.1 Spettroscopia infrarossa FTIR

La spettrofotometria IR [158] è una tecnica piuttosto recente, sebbene la regione dell'infrarosso fosse stata scoperta più di un secolo e mezzo fa da Sir F. W. Hershel. Difficoltà di ordine strumentale ne hanno precluso lo sviluppo e la conseguente diffusione fino al 1940. Attualmente la disponibilità di strumenti altamente perfezionati ha posto la spettroscopia IR alla portata anche di non specialisti. L'assorbimento della radiazione infrarossa (numero d'onda compreso tra 13000-10cm⁻¹) comporta una variazione degli stati vibrazionali molecolari. Di conseguenza lo studio degli spettri di assorbimento infrarosso permette di trarre informazioni sulla flessibilità delle molecole, cioè sulla facilità con cui le lunghezze degli angoli di legame possono variare rispetto ai valori che essi possiedono nella configurazione d'equilibrio.

Una molecola possiede 3 gradi di libertà ovvero quelli traslazionali, rotazionali e vibrazionali.

Il numero di gradi di libertà vibrazionali che definiscono tutto il movimento vibrazionale dell'insieme molecolare è 3n-6 (3n-5 per una molecola lineare).

Nel suo aspetto più elementare, la teoria delle vibrazioni molecolari ammette che un legame chimico fra due atomi possa essere in prima approssimazione paragonato ad un sistema costituito da due sfere collegate con una molla. La forza di richiamo è quindi di natura elastica ed è descrivibile con la legge di Hooke, la quale stabilisce che quando una molla viene allontanata dalla posizione di equilibrio si crea una forza tendente a riportare la molla nella posizione di equilibrio, forza che è proporzionale allo spostamento x subito:

$$\mathbf{F} = - \mathbf{kx}$$

L'equazione è scritta con il segno meno a mostrare esplicitamente che, sebbene F agisca nella direzione opposta allo spostamento subito dalla molla, la costante di proporzionalità k è positiva. Tale costante detta costante di forza rappresenta il valore dell'intensità della forza per uno spostamento unitario dalla posizione d'equilibrio. Essa è, quindi, una misura della flessibilità della molla: una molla forte

e poco flessibile avrà un alto valore di k , viceversa una molla debole e flessibile avrà un valore di k piccolo.

Nel caso di molecole biatomiche l'unica possibilità vibrazionale è rappresentata dallo stiramento (*stretching*) del legame chimico tra i due atomi e, a seconda della forza del legame e della massa degli atomi legati, si hanno assorbimenti a differente lunghezza d'onda (e quindi di energia) della radiazione infrarossa. Ovviamente una descrizione più dettagliata del fenomeno vibrazionale connesso all'assorbimento della radiazione infrarossa richiederebbe una trattazione quantomeccanica e quindi la soluzione dell'equazione di Schroedinger per un oscillatore armonico, dunque, l'esistenza delle regole di selezione che rendono possibili solo determinate vibrazioni ovvero determinate variazioni del momento elettrico.

Per molecole poliatomiche gli assorbimenti che appaiono nello spettro infrarosso possono avere origine principalmente da vibrazioni lungo un ben definito legame oppure dalla combinazione fra di loro di vibrazioni di legami adiacenti cioè: fenomeno di accoppiamento vibrazionale .

Inoltre l'insieme delle vibrazioni, può venire solo lungo le direzioni di legame ed in tal caso si parla di bande di stiramento o *stretching* oppure le vibrazioni si combinano in maniera tale da generare una deformazione degli angoli di legami ed in tal caso si parla di bande di deformazione o *bending*. L'accoppiamento vibrazionale avviene soltanto fra due o più legami che siano fra loro vicini nella struttura molecolare e che siano di energia vibrazionale comparabile.

Al crescere del numero di atomi di una molecola aumenta ovviamente il numero di vibrazioni normali. Ciò comporterebbe una gran difficoltà nell'interpretazione dello spettro se l'insieme delle bande di assorbimento che costituiscono uno spettro avesse una distribuzione casuale o non classificabile. Fortunatamente composti diversi che hanno un particolare gruppo o legame in comune, mostrano bande di assorbimento simili attribuibili a quel gruppo. Così un gruppo funzionale corrispondente ad un certo legame chimico assorbe quasi sempre in una regione ben definita dello spettro infrarosso indipendentemente dalla natura del resto della molecola. Tale approssimazione è detta approssimazione di gruppo.

In conclusione lo spettro infrarosso di una molecola complessa può essere diviso in due principali regioni: in una, detta regione dei gruppi funzionali, vi sono solamente le vibrazioni di stiramento di gruppi funzionali più alcune bande di assorbimento dovute ad effetti secondari ed in un'altra, detta regione delle impronte

digitali (*fingerprint*), vi è un insieme complesso di vibrazioni caratteristiche di una molecola.

Un moderno spettrofotometro per IR si presenta come uno strumento complicatissimo specialmente dal punto di vista meccanico ed elettrico, il principio di funzionamento è comunque piuttosto semplice. Tutti gli spettrofotometri per IR si compongono degli stessi elementi essenziali: una sorgente di energia raggiante, le celle per i campioni, un monocromatore, un rivelatore ed infine un registratore automatico. In generale, questi strumenti coprono l'intervallo 2-15 μ in circa 12 minuti con una risoluzione compresa tra 3 cm^{-1} e 2000 cm^{-1} usando un prisma di salgemma. Essi hanno un'unità fotometrica a doppio raggio, passanti rispettivamente attraverso la cella contenente il campione e la sostanza di riferimento. Uno specchio mobile nel fotometro invia alternativamente i due raggi nel monocromatore. Così ad ogni lunghezza d'onda il rivelatore paragona in rapida successione l'energia di ciascun raggio. Questa differenza tra i due segnali amplificati, azionerà un servomeccanismo su un dispositivo ottico che agisce sul raggio di riferimento fino a ridurne l'intensità ad un valore corrispondente a quello del raggio proveniente dal campione in esame. In sincronismo con l'attenuatore si muove la penna scrivente del registratore, la cui traccia sulla carta è proporzionale all'entità di riduzione subita dal raggio di riferimento, offrendo quindi una misura dell'assorbimento.

Oltre che per lo studio dei composti organici la spettroscopia IR è utilizzata per l'identificazione di sostanze e studi sulla struttura di sostanze allo stato solido. In tal caso il campione viene disperso in un alogenuro alcalino in rapporto 1 a 100 e poi pressato fino a formare un dischetto da porre in un apposito contenitore.

A.2 Diffrazione dei raggi X

Indubbiamente la più importante e utilizzata tecnica nella chimica dello stato solido è la diffrazione dei raggi X [159,160], utilizzata, sin dal 1912, per la caratterizzazione ed identificazione dei materiali cristallini e per la determinazione della loro struttura cristallina.

Un esperimento di diffrazione è basato sulla legge di Bragg:

$$2d\sin\theta = n\lambda$$

secondo cui la distanza perpendicolare d tra due piani cristallini adiacenti, l'angolo di incidenza dei raggi x , θ , e la distanza $n\lambda$ (differenza di percorso del raggio diffratto dal n -mo piano successivo a quello in esame) devono essere correlate; quando la legge di Bragg è soddisfatta, i raggi riflessi sono in fase e l'interferenza è costruttiva.

Ridotto all'essenziale, un esperimento di diffrazione dei raggi X, richiede una sorgente di raggi X, un filtro monocromatore, il campione da investigare ed un rivelatore che raccolga i raggi diffratti.

Il fascio di raggi monocromatici incide su di un campione finemente polverizzato, che, teoricamente ha cristalli e piani reticolari arrangiati a caso in ogni possibile orientamento. Per ciascun fascio di piani, dunque, almeno alcuni devono essere orientati in modo tale da soddisfare la legge di Bragg e quindi dare interferenza costruttiva.

Il fascio diffratto può essere analizzato circondando il campione con una pellicola fotografica, che si lascia impressionare, oppure usando un contatore, es. un contatore Geiger, in movimento collegato ad un registratore a carta o ad uscita digitale. Quest'ultimo è lo schema da noi utilizzato, detto anche diffrattometro; negli usi normali il contatore Geiger è programmato per scandire un intervallo di valori 2θ a una velocità angolare costante (di solito si ci riferisce all'angolo 2θ tra fascio diffratto e non diffratto, piuttosto che all'angolo di Bragg θ). Di solito l'intervallo 10 - $80^\circ 2\theta$ è sufficiente a coprire le parti essenziali del diffrattogramma.

La velocità di scansione del contatore da noi utilizzata è di $120^\circ/\text{min}$ e occorre circa un'ora per ottenere la traccia completa. Le intensità sono prese come altezza dei picchi; se si desidera avere valori accurati delle intensità e delle distanze interplanari d è conveniente ridurre la velocità di scansione.

Abbiamo impiegato il metodo delle polveri per l'identificazione delle fasi cristalline. Mentre la maggior parte dei metodi chimici di analisi danno informazioni sugli

elementi presenti in un campione, il metodo delle polveri è forse l'unico che ci dice quali composti o fasi cristalline sono presenti ma non dà informazioni dirette sulla loro composizione chimica.

Per l'identificazione di materiali cristallini incogniti sono state utilizzate delle biblioteche di schede, note come schede ASTM, che contengono i dati riepilogativi dei diffrattogrammi di circa 35000 materiali inorganici (è disponibile anche una sezione per materiali organici). Naturalmente sarebbe impossibile paragonare il diffrattogramma del nostro campione con tutti gli altri disponibili in letteratura; in genere si hanno delle indicazioni sui composti che potrebbero essere presenti per cui il confronto si effettua su una serie limitata di possibili casi tra cui ricercare quello più attendibile e permette così l'identificazione della sostanza. Ciò non significa che è sempre facile ottenere un'analisi ai raggi X attendibile.

La preparazione del campione è molto importante e può essere difficile se non impossibile evitare orientazioni preferenziali dei cristalli del provino. Per questo le polveri sono state pestate in un mortaio per ridurre a particelle di dimensioni comprese tra 1 e 10 μm ; anche la presenza di pochi cristalli relativamente grandi (es. 1 mm di diametro) in uno strato di polvere fine può rovinare il diffrattogramma.

La quantità di campione utilizzata si aggira sui 100 mg; la polvere fine ottenuta ed alloggiata in opportuni porta campioni nei quali è compattata fino a formare uno strato sottile, omogeneo senza vuoti.

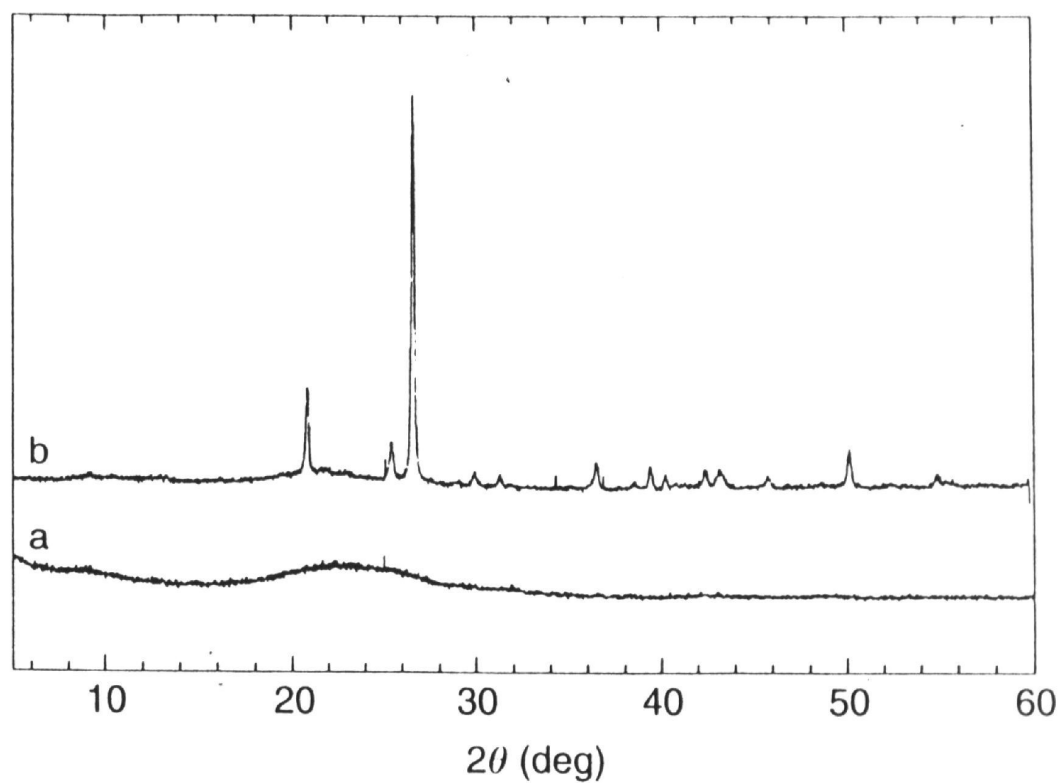


Fig. A.1 Tipico diffrattogramma di una sostanza amorfa

La fig.A.1 riporta il diffrattogramma di una sostanza allo stato amorfo e la banda larga che si registra è dovuta all'assenza di piani cristallini e quindi di ordine tridimensionale nel solido; invece il diffrattogramma della stessa sostanza cristallina presenta, fig.A.1, numerose linee sottili relative ai diversi piani cristallini.

A.3 Microscopia

Le immagini ottenute con i microscopi elettronici non contengono mai informazioni precise sulla struttura tridimensionale della superficie del campione e l'apparente tridimensionalità di molte di esse è solo frutto di un'abile manipolazione dei colori o dei toni di grigio ottenuta al calcolatore. Le sole immagini a risoluzione nanometrica che contengono informazioni reali sulla topografia tridimensionale del campione sono quelle ottenute dai microscopi con sonda a scansione, strumenti indicati con l'acronimo SPM (Scanning Probe Microscope) [161]. Anche se la tecnologia SPM ha meno di dieci anni, essa si è sviluppata così rapidamente da consentire oggi di risolvere moltissimi problemi nello studio della fisica delle superfici, trovando applicazione nei più svariati settori (metalli, semiconduttori, polimeri, ceramiche, ecc). Con gli SPM si possono rivelare dettagli (con accuratezza diversamente irraggiungibile) di campioni sia in aria che immersi in liquido; si possono evidenziare strutture di dimensioni atomiche su aree dell'ordine del decimo di millimetro, e in una singola immagine si può ottenere una risoluzione verticale di centesimi di nanometro in strutture il cui profilo raggiunge corrugazioni dell'ordine di qualche micron. I vari SPM, hanno in comune il fatto che utilizzano tutti dei dispositivi piezoelettrici per variare con estrema precisione la posizione (x, y) di un sensore a punta sulla superficie del campione analizzato e la distanza (z) tra la punta e la superficie. Il segnale prodotto dal sensore viene utilizzato per costruire un'immagine tridimensionale (x, y, z) mediante un elaboratore elettronico interfacciato al sensore e al dispositivo piezoelettrico che campiona l'interazione tra punta e superficie su una matrice di punti. A seconda dei diversi fenomeni fisici che producono il segnale si distinguono diversi tipi di SPM. Si può fare una prima distinzione tra STM (Scanning Tunneling Microscope), ove il segnale è fornito dalla corrente elettronica di tunnelling tra punta e campione, e SFM¹(Scanning Force Microscope), che misura una qualche forza di interazione tra punta e campione (forze interatomiche, magnetiche, elettrostatiche, di adesione)

Microscopi elettronici

I microscopi elettronici si possono dividere in due grandi categorie: SEM, acronimo che sta per Scanning (Reflection) Electron Microscope e STEM per Scanning Trasmission Electron Microscope. In entrambi l'immagine viene normalmente ottenuta rivelando un segnale prodotto da un sottile fascio di elettroni ad alta energia

¹ Il microscopio a scansione di forza è detto talvolta anche microscopio a "forza atomica" (AFM), con allusione al fatto che esso misura proprio le interazioni tra atomi della sonda e atomi del campione.

(10-500 keV), generato da un cannone elettronico analogo a quello contenuto in un comune televisore.

Gli elettroni del fascio attraversano una regione ove opportuni elettrodi generano campi elettrici e magnetici capaci di guidare la traiettoria in un percorso a zig-zag che permette di coprire una piccola zona del campione (che, diversamente dal caso del monitor televisivo, è dell'ordine di frazioni di mm^2). Per evitare che gli elettroni perdano energia e che si sparpaglino

diverse componenti. Il cannone elettronico, è costituito da un supporto per effetto di collisioni con molecole di gas, è necessario mantenere il cannone, le lenti e il campione in un contenitore a vuoto molto spinto ($\approx 10^{-11}\text{Pa}$).

Le collisioni degli elettroni con il campione producono emissione di fotoni o d'elettroni secondari che, nel caso del SEM, vengono raccolti da opportuni rivelatori generando un'immagine della zona spazzolata dal fascio.

Nel caso dello STEM, l'immagine viene creata, invece, rivelando gli elettroni che vengono *trasmessi* attraverso il campione, che a tal fine viene reso sottilissimo nella zona da analizzare.

Da quanto detto, si comprende che è inevitabile per queste tecniche una forte interazione sul campione che viene sempre (poco o tanto) alterato dal fascio elettronico. Inoltre, qualsiasi immagine contiene informazione prodotta da uno strato (la cui profondità dipende dalla *natura del campione* e dall'*energia del fascio*) che è molto sottile, ma che non è mai il solo primo strato atomico.

In definitiva, si può dire che le immagini SEM e STEM possono fornire informazioni sulla *composizione e sulla natura microscopica di uno strato superficiale del campione*, ma non una reale ricostruzione topografica tridimensionale della sua superficie.

- **SEM:**

Il microscopio elettronico a scansione [180], permette di osservare la superficie del campione, ottenendo un'immagine tridimensionale con un potere di risoluzione di circa 60 \AA . Il SEM presenta diverse componenti. Il

cannone elettronico, è costituito da un supporto in cui il filamento ad incandescenza è inserito ad una certa distanza dall'anodo e mantenuto ad elevato potenziale. Il filamento di tungsteno emette per effetto termoionico un fascio di elettroni, il cui numero è funzione dell'intensità della corrente applicata. Gli elettroni emessi attraverso la griglia, che funziona da lente elettrostatica di focalizzazione ed è

mantenuta ad un potenziale negativo, passano attraverso l'anodo ricevendo una forte accelerazione. A questo punto un sistema di lenti elettromagnetiche focalizza il pennello elettronico con un diametro dell'ordine di 100 \AA . Tutta l'apparecchiatura viene tenuta sotto vuoto al fine di minimizzare le possibili interazioni tra il pennello elettronico e le molecole di aria che potrebbero determinare un allargamento del fascio elettronico. La scansione permette al pennello elettronico, mediante deflessioni magnetiche, di esplorare la superficie del campione per un'area di circa 5.000 \AA quadrati in un tempo di circa 2 secondi. Il segnale ottenuto viene visualizzato su di un tubo catodico e può essere modulato e comandato in modo da variare l'ingrandimento dell'immagine osservata. Il preparato da esaminare viene posto all'interno della camera porta campione; il campione viene montato su una slitta che può essere traslata secondo le tre posizioni ortogonali e quindi spostata a piacimento sotto il fascio elettronico. L'impatto del fascio elettronico sulla superficie del campione determina la produzione di alcuni tipi di segnale tra cui i più importanti sono gli elettroni secondari, gli elettroni retrodiffusi ed i raggi X. Di questi, gli elettroni secondari sono utilizzati per ricavare informazioni di tipo morfologico sul campione, gli elettroni retrodiffusi permettono di individuare fasi cristalline diverse sulla base delle differenze di numero atomico degli elementi chimici che costituiscono il campione, i raggi X, infine, forniscono informazioni qualitative e quantitative sulla composizione chimica del campione.

- **STM: Scanning Tunnelling Microscope**

Il microscopio tunnelling a scansione, nato nel 1981 da un'idea di Gerd Binnig ed Heinrich Rohrer, può venir considerato il capostipite di tutti i microscopi a scansione di sonda.

Se si considerano particelle cariche (elettroni) con energia totale E_0 , chiuse in una "scatola", le cui pareti formino un "guscio" ad energia potenziale E_1 , con $E_1 > E_0$, classicamente è impossibile che le particelle escano dalla scatola; perché ciò avvenga dovrebbero acquisire un'energia maggiore di E_1 . Quantisticamente, invece, esiste una probabilità finita che qualche particella di energia $E_0 < E_1$ attraversi la barriera di potenziale: questo passaggio "attraverso la barriera" viene detto *effetto tunnel*.

Consideriamo ora gli elettroni di conduzione in una sottile punta metallica affacciata ad un altro conduttore e da lui separata da uno strato isolante, ad esempio aria. L'energia potenziale degli elettroni nel materiale conduttore è minore che

nell'isolante, e, quindi, se non si impartisce a questi elettroni una grande energia cinetica (ad esempio riscaldando il metallo) essi sono bloccati dalla intercapedine isolante, anche se tra i due conduttori si applica una differenza di potenziale V .

Ciò vale rigorosamente solo nella descrizione della fisica classica: il modello quantistico, invece, predice che, *se lo spessore dell'isolante è sufficientemente piccolo*, s'instaura un flusso di particelle attraverso la barriera, e, quindi, una corrente di tunnelling.

La teoria prevede che la corrente di tunnel decresca esponenzialmente con la distanza punta-campione, il che fornisce un sensibilissimo metodo per discriminare la rugosità del campione stesso. Basta, infatti, imporre che la corrente di tunnel venga mantenuta costante da un circuito di feedback durante lo spostamento reciproco punta-campione, il che implica ovviamente che la punta dovrà avvicinarsi al campione in corrispondenza di “valli” ed allontanarsi da esso in presenza di “monti”. Il sistema registra proprio lo spostamento della punta (o del campione), che è una esatta fotografia delle asperità superficiali del campione in esame.

Il microscopio STM può in realtà lavorare sia nella modalità sopra menzionata (“a corrente costante”), sia in una diversa modalità (“a quota costante”), in cui viene registrata la variazione di corrente di tunnel conseguente al mantenimento di una determinata distanza punta-campione durante la scansione.

- **AFM: un sensore meccanico-ottico di forze interatomiche**

L'AFM si basa anch'esso su interazioni punta-campione, ma questa volta la punta è di materiale non conduttore e l'interazione si basa sulle forze attrattive o repulsive che si esercitano fra i due mezzi. Già da questo si evince che la tecnica consente di analizzare campioni anche non conduttori, a differenza di quanto può fare l'STM. La punta è costituita all'estremità da una levetta detta “cantilever”. Una volta impostato un valore di forza fra punta e campione, esso viene mantenuto costante durante le scansioni da un sistema in retroazione, che avvicina o allontana la punta dal campione. Questi spostamenti verticali permettono, come per l'STM, di ricostruire la superficie del campione. Diverse forze contribuiscono alla deflessione della punta, ma le principali sono quelle di Van der Waals, le forze capillari dovute alla presenza di acqua nell'ambiente di misura e la forza esercitata dalla cantilever stessa; se portate in sufficiente prossimità, la punta ed il campione generano dunque, una forza che può essere repulsiva o attrattiva. In ogni caso si parla di “contatto” fra punta e

campione. Tale modalità della tecnica prende il nome di AFM contact-mode. Da questa situazione si può misurare il profilo del campione in due modi, detti rispettivamente “a forza costante” e “a quota costante”, simili al caso dell’STM. Una forza di contatto molto elevata causa una marcata repulsione della cantilever dal campione perché le forze in gioco diventano molto grandi. Laddove il campione sia abbastanza malleabile o soffice, impone un’elevata forza di interazione ad una cantilever di adeguata costante elastica permette di “scalpire” o “arare” il campione stesso con interessanti prospettive. L’AFM è costituito, inoltre, da un sottile raggio di luce emesso da un diodo laser che viene riflesso dall’estremità mobile della leva e rivelato da un fotodiodo a due settori (vedi figura 1). I microscopi elettronici non possono dare un rilievo topografico delle superfici analizzate, informazione che, invece, è accessibile ai microscopi a forza atomica. La normale definizione di “superficie di un solido”, che nel mondo macroscopico è il luogo geometrico dei punti che separano il solido in oggetto dal “resto”, perde di significato quando si scende a livello microscopico, ove ogni atomo è separato da tutti gli atomi circostanti. Per definire ancora una superficie a livello microscopico, ove la materia rivela la sua natura discreta (quantizzata), si può tuttavia ricorrere ad una definizione operativa, e dire, ad esempio, che il solido finisce dove la forza sentita da un atomo “sonda” raggiunge un valore arbitrariamente fissato.

Questa superficie, luogo geometrico dei punti dello spazio ove una sonda di dimensioni atomiche sente una data forza, è proprio la superficie costruita da un AFM operante a forza costante.

Dato che l’andamento delle forze interatomiche è praticamente indipendente dalla natura degli atomi interagenti, la microscopia a forza atomica non è sensibile alla composizione chimica della superficie, e questo è uno dei suoi limiti principali (ad esempio, rispetto alla tecnica SEM).

D’altra parte la tecnica AFM può rivelare, invece la distribuzione di carica elettrica o di domini magnetici alla superficie di un campione.

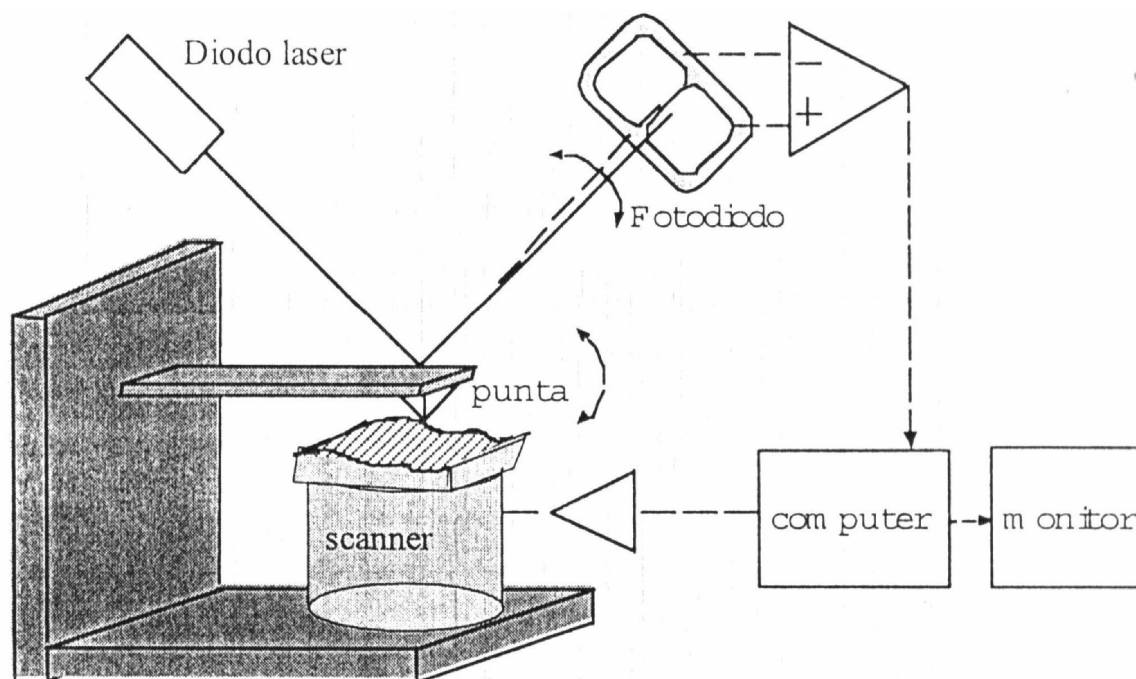


Fig. A.2 Schema a blocchi di AFM a leva ottica

Supponiamo che quando la leva è a riposo il raggio riflesso illumini ugualmente i due settori del fotodiodo. Se tra gli atomi della punta e quelli della superficie del campione si fa sentire una forza di interazione, questa forza si trasmette alla leva che *si flette facendo deviare il raggio riflesso* che illuminerà i due settori in modo diverso. Se in queste condizioni misuriamo la differenza tra i segnali prodotti dai due settori del fotodiodo, il segnale risultante sarà una qualche funzione della forza che flette la leva. In ogni punto del campione, la *forza interatomica*, che dipende dalla distanza punta-campione è *misurata, quindi, dal segnale elettrico* prodotto dalla differenza di illuminazione dei due fotodiodo.

- **AFM non-contact-mode**

Questa tecnica prevede di mettere in oscillazione la cantilever in prossimità del campione.

L'ampiezza dell'oscillazione è di decine o centinaia di angstrom, portando, così, la punta in zone di "non contatto" con il campione, secondo quanto descritto dalle forze di Van der Waals. Questa tecnica consente di visualizzare la topografia del campione in condizioni di "poco" contatto, con conseguenti vantaggi dovuti all'assenza di forti interazioni con la punta, tali da produrre effetti convolutivi indesiderati nella risposta. La tecnica impone di usare cantilever più rigide di quelle usate in "contact mode" e di lavorare a bassi valori di forza. Ciò implica la necessità

di misurare segnali più piccoli e più rumorosi, per cui il sistema si complica notevolmente, imponendo la presenza di un demodulatore sincrono.

- **AFM tapping-mode**

Questa tecnica è parente molto stretta della precedente, dalla quale si differenzia unicamente per il fatto che la punta è portata più vicino al campione, quindi, durante l'oscillazione, essa tocca la superficie da analizzare. Per il resto sia la tecnica che il metodo di misura ad essa legata sono identici quelli dell'AFM non-contact-mode; essa, inoltre, fornisce migliori risultati su scansioni grandi, in cui vi sono forti variazioni topografiche.

Bibliografia

- [1] L.R. Pietrabissa. "Biomateriali per Protesi e Organi Artificiali". Petron, Bologna (1996).
- [2] C. Migliaresi, L. Nicolais. "Composite materials for Biomedical Applications" Int. Jour. Art. Organs, 1114-1118 (1980).
- [3] L. Ambrosio, G. Peluso, P. Davis. "Biomaterials and their Compatibilities" Handbook of Biomaterials and Applications.
- [4] L.C. Klein. Sol-Gel Tecnology for Thin Films, Fibers, Preforms, Electronics, and especially Shapes. Ed., Noyes, Park Ridge, N:J., (1988).
- [5] C.J. Brinker, G.W. Scherrer. Sol-Gel Science, the Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing. Academic, San-Diego, CA, (1990).
- [6] J. Livage, M. Henry, C. Sanchez. Progress in Solid State Chemistry, 18, 259 (1988).
- [7] C. Sanchez, F. Ribot, S. Doeuff: in Inorganic and Organometallic Polymers with special Properties. R.M. Laine, Ed., Nato ASI series (vol.206), Kluwer, New York, p.267, (1992).
- [8] D.C. Bradley, R.C. Mehrota, D.P. Gaur. Metal Alkoxides, Academic, London, (1978).
- [9] L.G. Hubert-Pfalzgraf. New J. Chem. 11, 663 (1987).
- [10] P. Auderbert, P. Hapiot, P. Griesmar, C. Sanchez. J. Mater. Chem. 1(4), 699 (1991).
- [11] B. Cabane, M. Dubois, R. J. Duplessix. Phys. Paris, 48, 2131 (1987).
- [12] M. Kallala, C. Sanchez, B. Cabane Phys. Rev. E. 48(5), 3692 (1993).
- [13] B.E. Yoldas. J. Mater. Sci. 21, 1086 (1986).
- [14] S. Doeuff, M. Henry, C. Sanchez, J. Livage. J. Non-Cryst. Solids 89, 1987 (1987).
- [15] C. Sanchez, J. Livage, M. Henry, F. Babonneau. J. Non-Cryst. Solids. 100, 650 (1988).
- [16] R.C. Mehrota, R. Bohara, D.P. Gaur. Metal β -Diketonates and Allied Derivatives, Academic, London, (1978).
- [17] D.C. Bradley. Coord. Chem. Rev. 2, 299 (1967).
- [18] F. Ribot, P. Toledano, C. Sanchez. Chem. Mater. 3, 759 (1991).
- [19] B. Vaartstra, J.C. Daran, P.S. Gradeff, L.G. Hubert-Pfalzgraf, J.C. Huffman, S. Parraud, K. Yunlu, K.G. Caulton. Inorg. Chem. 29, 3126 (1990).

- [20] (a) P. Tolénado, F. Ribot, C. Sanchez. *Acta Cryst.*, C46, 1419 (1990); (b) F. Babonneau, S. Doeuff, A. Léaustic, C. Sanchez, C. Cartier, M. Verdaguer. *Inorg. Chem.* 27, 3166 (1988).
- [21] H. Kallala, C. Sanchez, B. Cabane. *J. Non-Cryst. Solids*, 147&148, 189 (1992).
- [22] A. Léaustic, F. Babonneau, J. Livage. *Chem. Mater.* 1, 240 (1989); (b) A. Léaustic, F. Babonneau, J. Livage. *Chem. Mater.* 1, 248 (1989); (c) W.C. Lacourse, S.Kim, in *Science of Ceramic Processing*, L.L. Hench, D.R. Ulrich. Eds., Wiley, New York, 304 (1986).
- [23] C. Sanchez, P. Toledano, P. Griesmar. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.*, 271, 669 (1992).
- [24] J.C. Debsikar. *J. Non-Cryst. Solids*, 87, 343 (1986).
- [25] J.C. Debsikar. *J. Mater. Sci.* 20, 44 (1985).
- [26] J. Livage, C. Sanchez. *J. Non-Cryst. Solids*, 145, 11 (1992).
- [27] P. Papet, N. LeBars, J.F. Baumard, A. Lecomte, A. Dager. *J. Mater. Sci.* 24, 3850 (1989).
- [28] P. Toledano, C. Sanchez, *C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. II*, 311, 1161 (1990).
- [29] G.L. Wilkes, B. Orler, H.H. Huang. *Polymer Prep.*, 26(2), 300 (1985).
- [30] G.S. Sur, J.E. Mark. *Eur. Polym. J.* 21(12), 1051 (1985).
- [31] A. Morikawa, Y. Iyoku, M. Kakimoto, Y. Imai. *J. Mater. Chem.* 2(7), 679, (1992).
- [32] K. Izumi, H. Tanaka, M. Muratami, T. Degusti, A. Morita, N. Toghe, T. J. Minami. *Non-Cryst. Solids*, 21, 344 (1990).
- [33] Y. Chujo, T. Saegusa. *Adv. Polym. Sci.* 100, 11 (1992).
- [34] D. Avnir, D. Levy, R. Reisfeld. *J. Phys. Chem.* 88, 5956 (1984).
- [35] J.D. Mackenzie, D.R. Ulrich. *Sol-Gel Optics I. Eds., Proc. SPIE 1328*, SPIE, Washington, D.C. (1990).
- [36] J.D. Mackenzie. *Sol-Gel Optics II. Ed., Proc. SPIE 1758*, SPIE, Washington, D.C. (1992).
- [37] B. Dunn, J.I. Zink. *J. Mater. Chem.* 1(6), 903 (1991).
- [38] S.J. Kramer, M.W. Colby, J.D. Mackenzie, B.R. Mattes, R.B. Kaner, in *Chemical Processing of Advanced Materials*, L.L. Hench, J.K. West, Eds., Wiley, New York, 737, (1992).

- [39] (a) S. Braun, S. Rappoport, R. Zusman, D. Avnir, M. Ottolenghi. *Mater. Lett.*, 10, 1 (1990). (b) D. Avnir, S. Braun, M. Ottolenghi, in *Supramolecular Architecture in 2 and 3 Dimensions*, Bein T., Ed., ACS Symp. Ser., (1992).
- [40] L.M. Ellerby, C.R. Nishida, F. Nishida, S.A. Yamanaka, B. Dunn, J.S. Valentine, J.I. Zink. *Science*, 255, 1113 (1992).
- [41] S.A. Yamanaka, F. Nishida, L.M. Ellwrby, C.R. Nishida, B. Dunn, J.S. Valentine, J.I. Zink. *Chem. Mater.* 4(3), 495 (1992).
- [42] P. Audebert, C. Demaille, C. Sanchez. *Mater. Chem.* 5, 911 (1993).
- [43] D. Avnir, S. Braun, O. Lev., M. Ottolenghi. *Sol-gel Optics II*, Proc. SPIE 1758, SPIE, Washington, D.C., p. 456 (1992).
- [44] H. Schmidt, B. Seiferling. *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.* 73, 739 (1986).
- [45] B. Wang, G.L. Wilkes, C.D. Smith, J.E. McGrath. *Polym. Commun.* 32, 400 (1991).
- [46] (a) P. Judeinstein, J. Livage, J.A. Zarudiansky, R. Rose. *Solid State Ionics*, 28-30, 1722 (1988); (b) M. Nabavi, S. Doeuff, C. Sanchez, J. Livage *J. Mater. Sci. Eng. B3*, 203 (1989).
- [47] B. Kasemo, J. Lausmaa. *Crit Rev Biocomp* 2, 335-380 (1986).
- [48] S. Takahiro, T. Yamamoto, M. Toriyama, K. Nishizawa, Y. Yokogawa, M.R. Mucalo, Y. Kawamoto, F. Nagata, T. Kameyama. *J Biomed Mater Res* 34, 507-517 (1997).
- [49] B. Kasemo, J. Lausmaa. *Material-tissues interfaces: the role of surface properties and processes. Environ Health Prospect* 102, 41-45 (1994).
- [50] L.L. Hench. *Bioactive ceramics. New York Acad Sci* 523, 54-71 (1988).
- [51] L.L. Hench, J. Wilson. *Science* 226, 630-636 (1984).
- [52] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson. *Molecular biology of the cell. New York, London: Garland Publishing Inc*, 613 (1989).
- [53] L.A. Amos, W.B. Amos. *Molecules of the cytoskeleton. Hampshire: MacMillan Molecular Biology*, 94 (1991).
- [54] G.M. Cooper. "The Cell, a Molecular Approach" Oxford University Press, 423 (1997).
- [55] J. Clover, R.A. Dodds, M. Gowen. *J. Cell Sci.* 103, 267 (1992).
- [56] I. Degasne, M.F. Basle, V. Demais, G. Hure, M. Lesourd, B. Grolleau, L. Mercier, D. Chappard. *Calcified Tissue Int.* 64, 499 (1999).

- [57] R.K. Sinha, F. Morris, S.A. Shah, R.S. Tuan. Clin Orthop. And Related res. 305, 258 (1994).
- [58] R.K. Sinha, R.S. Tuan. Bone 18, 451 (1996).
- [59] A.F. Von Recum, T.G. Van Kooten. J. Biomater. Sci. Polym. Ed. 7, 181 (1995).
- [60] C.H. Damsky. Bone 25, 95 (1999).
- [61] Williams D.F. Progress in biomedical engineering, definitions in biomaterials. 4, 54 (Elsevier, Amsterdam) 54 (1987).
- [62] A. Dekker, C. Panfil, M. Valdor, G. Pennartz, H. Richter, C.H. Mittermayer, C.J. Kirkpatrick. Cells and Mater., 4, 101-112 (1994).
- [63] C.J. Kirkpatrick, C.H. Mittermayer. J. Mater. Sci., Mater. Medicine, 1 9-13 (1990).
- [64] H.G. Gratzner. Science 218, 474-475 (1982).
- [65] P.A. Revell. Normal bone. In pathology of Bone. Anonymous New York: Springer-verlag (1986).
- [66] G. Stein, J. Lian. Molecular mechanism mediatine developmental and hormone-regulated expression of genes in osteoblasts. In cellular and molecular biology of bone. Ed. M. Node. New York: Academic press. 47-91 (1993).
- [67] S.A. Harris, R.J. Enger, B.L.O. Riggs, T.C. Spelsberg. J. Bone Miner Res 10, 178-186 (1995).
- [68] R.M. McAllister, M.B. Gardner, A.E. Green, C. Bradt, W.W. Nichols, B.H. Landing. Cancer 27, 397-402 (1971).
- [69] J.E. Aubin, J.N. Heersche, M.J. Merrilees, J. Sodek. J. Cell Biol 92, 452-461 (1982).
- [70] H. Sudo, H.A. Kodama, Y. Amagai, S. Yamamoto, S. Kasai. J Cell Biol 96, 191-198 (1983).
- [71] G.A. Rodan, S.B. Rodan. Bone and Mineral Research 2, 244-286 (1983).
- [72] R.Schmidt, K.D. Kulbe. Bone and Mineral. 20, 211-221 (1993).
- [73] L. Di Silvio, N. Gurav. Osteoblasts. In Human cell culture. Eds M.R. Koller, B.O. Palsson and J.R.W. Masters (Great Britain). Kluwer Academic Publishers. Vol. V, 221-241 (2001).
- [74] R. Bizios. Biotechnology and Bioengineering. 43, 582-585 (1994).
- [75] R. Courtney-Harris, M. Kaiser, S. Downes. Biomaterials 16, 489-495 (1995).
- [76] G. Wong, B. Hall. In Bone Vol.1 Telford press. 171-191 (1990).

- [77] L. Di Silvio. A novel application of two biomaterials for the delivery of growth hormone and its effect on osteoblasts. University of London Ph.D. (1995).
- [78] S. Jones, A. Boyde. *Cell and Tissue Research*. 169, 449-465 (1976).
- [79] J. Gallagher, D. Woods, J. Beresford, C. Sheard, J. Dillon, R. Russel, S. Ali. Elsevier Science Publishers (Biomedical division) 119-127 (1986).
- [80] B. Ecarot-Charrier, F. Glorieux, M. Van Der Rest, G. Perira. *Journal of Cell Biology*. 96, 639-643 (1983).
- [81] P. Robey, J. Termine. *Calcified tissue international*. 37, 453-460 (1983).
- [82] T. Komori, H. Yagi, S. Nomura, A. Yamaguchi, K. Sasaki, K. Deguchi, Y. Shimizu, R.T. Bronson, Y.H. Gao, M. Inada, M. Sato, R. Okamoto, Y. Kitamura, S. Yoshiki, T. Kishimoto. *Cell* 89, 755-764 (1997).
- [83] F. Otto, A.P. Thornell, T. Crompton, A. Denzel, K.C. Gilmour, I.R. Rosewell, G.W. Stamp, R.S. Beddington, S. Mundlos, B.R. Olsen, P.B. Selby, M.J. Owen. *Cell* 89, 765-771 (1997).
- [84] P. Ducy, R. Zhang, V. Geoffroy, A.L. Ridall, G. Karsenty. *Cell* 89, 747-754 (1997).
- [85] T. Komori, T. Kishimoto. *Curr Opin Genet Dev* 8, 494-499 (1998).
- [86] G.A. Rodan, R.J. Majeska. *Prog Clin Biol Res* 110 PtB, 249-259 (1982).
- [87] H. Chiba, N. Sawada, T. Ono, S. Ishii, M. Mori. *J Cancer Res* 84, 290-297 (1993).
- [88] L.C. Gerstenfeld, S.D. Chipman, J. Glowacki, J.B. Lian. *Dev Biol*. 122. 49-60 (1987).
- [89] J.R. Nefussi, M. Pouchelet, P. Collin, J.M. Sautier, G. Develay, N. Forest. *Bone* 10, 345-352 (1989).
- [90] A. Lomri, P.J. Marie. *Biochim Biophys Acta* 970, 333-342 (1988)
- [91] R.J. Majeska, G.A. Rodan. *J Biol Chem* 257, 3362-3365 (1982).
- [92] M.A. Aronow, L.C. Gerstenfeld, T.A. Owen, M.S. Tassinari, G.S. Stein, J.B. Lian. *J Cell Physiol* 143, 213-221 (1990).
- [93] J.B. Lian, G.S. Stein. *Crit Rev Oral Biol Med* 3, 269-305 (1992).
- [94] V. Riccio, R.F. Della, G. Marrone, R. Palombo, G. Guida, A. Oliva. *Clin. Orthop* 308, 73-78 (1994).
- [95] C.G. Bellows, J.E. Aubin, J.N. Heersche, M.E. Antsoz. *Calcify tissue Int* 38, 143-154 (1986).

- [96] M. Casser-Bette, A.B. Murray, E.I. Closs, V. Erfle, J. Schmidt. *Calcif Tissue Int* 46, 46-56 (1990).
- [97] C.G.Bellows, J.E. Aubin, J.N. Heersche. *Endocrinology* 121, 1985-1992 (1987).
- [98] Y. Koshihara, M. Kawamura, S. Endo, C. Tsutsumi, H. Kodama, H. Oda, S. Higaki. *In vitro Cell dev Biol* 25, 37-43 (1989).
- [99] N.S. Fedarko, P. Bianco, G.P. Robey, J.D. Termine. *J Bone Miner Res* 4, 121 (1989).
- [100] E. Stringa, G. Filanti, D. Ginciuglio, A. Albini, P. Manduca. *Bone* 16, 663-670 (1995).
- [101] G.S. Stein, J.B. Lian, T.A. FASEB J 4, 3111-3123 (1990).
- [102] B.A.Scheven, N.J. Hamilton, T.M. Fakkeldij, A.S. Duursma. *Growth Regul* 1, 160-167 (1991).
- [103] M. Kassem, W. Blum, J. Ristelli, L. Mosekilde, E.F. Eriksen. *Calcif tissue Int* 52, 222-226 (1993).
- [104] C. Chenu, A. Valentin-Opran, P. Chavassieux, S. Saez, P.J. Meunier, P.D. Delmas. *Bone* 11, 81-86 (1990).
- [105] H. Stracke, A. Schulz, D. Moeller, S. Rossol, H. Schatz. *Acta Endocrinol (Copenh)* 107, 16-24 (1984).
- [106] M.C. Sloomweg, S.C. Van Buul-Offers, M.P. Herrmann-Erlee, S.A. Duursma. *Acta Endocrinol (Copenh)* 118, 294-300 (1988).
- [107] G. Morel, P. Chavassieux, B. Barenton, P.M. Dubois, P.J. Meunier, G. Boivin. *Cell Tissue Res* 273, 279-286 (1993).
- [108] M. Ernst, E.R. Froesch. *Biochem Biophys Res Commun* 151, 142-147 (1988).
- [109] C. Schmid, J. Zapf, E.R. FEBS Lett 244, 328-332 (1989).
- [110] H.H. Quin, J.H. Dong, K.Y. Qiu, Y. Wei. *Journal of Applied Polymer Science*, Vol. 78, 1736-1768 (2000).
- [111] P. Judeinstein and C. Sauchez. *J. Mater. Chem.* 6(4), 511-525 (1996).
- [112] Y. Wei, J. Danliang, D.J. Brennan, D.N. Rivera, Q. Zhuang, N.J. di Nardo and K. Qiu. *Chem. Mater.* 10, 769 (1998).
- [113] C. Sanchez, F. Ribot. *New J. Chem.*, 18, 1007-1047 (1994).
- [114] M.Catauro, M.G.Raucci, F. De Gaetano and A. Marotta. *J. Mater. Sci.* 38, 3097-3102 (2003).

- [115] M. Catauro, M.G. Raucci, F. de Gaetano, A. Buri, A. Marotta and L. Ambrosio J.Mater. Sci.: Mater. Med. 15 991-995 (2004).
- [116] N.P. Bonsal, J. Mater. Sci. 27 (1982) 2992.
- [117] Aimat “Manuale dei Materiali per l’Ingegneria” Mc Grow-Hill.
- [118] H.L. Khor, K.W. Ng, J.T. Schantz, T.T Phan, T.C. Lim, S.H. Teoh, D.W. Hutmacher. Mater Sci Eng C 20, 71-5(2002).
- [119] ZK. Zhong, XZ. Sun. Polymer 42, 691-9 (2001).
- [120] K. Woei, DW. Hutmacher, JT. Schantz, C. Seng, HP. Too, T. Chye, TT. Phan, SH. Teoh. Tissue Eng 7, 441-55 (2001).
- [121] A. Christine, H. Jeannie, YS Yu, M. Dusica, A. Eisenberg. J. Controlled Release 63, 275-86 (2000).
- [122] D.W. Hutmacher, J.T. Schantz, I. Zein, S.H. Tech, K. C. Tan. J. Biomed Mater Res 55, 203-16 (2001).
- [123] Lang M., Chu C.C. J Polym Sci, Part A: Polym Chem. 39, 4214 (2001).
- [124] C.S. Wu. Polym Degrad Stab. 80, 127 (2003).
- [125] L. Wang, W. Ma, R.A. Gross, S.P. McCarthy. Polym Degrad Stab. 59, 161 (1998).
- [126] K.J. Lowry, K.R. Hanson, L. Bear, Y.B. Peng, R. Calaluce, M.L. Evans, J.O. Anglen, W.C. Allen. Journal of Biomedical Materials Research 36, 4 (1997).
- [127] C.G. Pitt, F.I. Chanson, Y.M. Hibionada, D.M. Klimas, and A. Schindler. Journal of Applied Polymer Science, Vol. 26, 3779-3787 (1981).
- [128] S.A.M. Ali, S.P. Zhang, P.J. Doherty and D. F. Williams. Biomaterials 14, 9 (1993).
- [129] C. Piconi, G. Maccauro. Biomaterials 20, 1-25 (1999).
- [130] E.C. Subbarao. Zirconia – an overview. In: Heuer AH, Hobbs LW, editors. Advances in ceramics, vol.3. Science and Technology of Zirconia. Amsterdam: Elsvier, 1-24 (1981).
- [131] R.L. Reis, F.J.Monteiro, J.Mater. Sci., Mater. Med. 457-462 (1994).
- [132] M.Jarcho. Clin. Orthop. Relat. Res.157, 259-278 (1981).
- [133] W.J. O’Brien. Dental implant materials. In: O’Brien WJ, editor. Dental materials and their selection. 2nd ed. Chicago: Quintessence Publishing Co., Inc. 29, 315 (1997).

- [134] D.F. Williams. Titanium and titanium alloys. In: Williams DF, editor. Biocompatibility of clinical implant materials. Boca Raton, FL: CRC Press. 9, 44 (1981).
- [135] E.A.B. Effah, P.D. Bianco, P. Ducheyne. J. Biomed Mater Res 29:73 80 (1995).
- [136] K.E. Healy, P. Ducheyne. J. Biomed Mater Res 26:79 90 (1992).
- [137] J.C. Wataha. J. Oral Rehabil. 23:79 90 (1996).
- [138] S.N. Bhaskar, D.E. Cutright, M.J. Knappo, J.D. Beasley, B. Perez, T.D. Driskell. Oral Surg Med Path 31, 282 (1971).
- [139] T. Kokubo, Boll.Soc. Esp. Ceram. Vid., Proceedings of the XVI int.Cong.on Glass, Madrid, 1 (31-C1), 119 (1992).
- [140] S. Dumitriu, M. Dumitriu. Polymeric drug carrier, in: S. Dumitriu (Ed), Polymeric Biomaterials, Marcell Dekker, New York, 447-448 (1994).
- [141] H.E. Junginger, Drug Targeting and Delivery: Concepts in dosage from design, Ellis Harwood, Chichester, (1992).
- [142] J. Wright, S.K. Chandrasekaran, R. Gale, D.A. Swanson. Controlled Release System. AIChE Symposium Series 77, 62 (1981).
- [143] R.H. Fitzgerald. Orthop. Clin. N. Amer. 15, 537 (1984).
- [144] A.G. Gristina, G. Giridhar, B.L. Gabriel, P.T. Naylor, Q.N. Myrvik. Int. J. Artif. Organs 16, 755 (1993).
- [145] B. Jansen, G. Peters. J. Hosp. Infect. 19, 83 (1991).
- [146] G.D. Christensen, L.M. Baddour, D.L. Hasty, J.E.I. Lowrance, W.A. Simpson, in "Infections associated with indwelling medical devices" edited by A.L. Bisno and F.A. Waldvogel (American Society for Microbiology) p.27 (1989).
- [147] A.G. Pristina. Clin. Orthop. Rel. Res. 298, 106 (1994).
- [148] V.V. Viljanen, T.J. Gao, T.C. Lindholm, T.S. Lindholm, B. Kommonen. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 25, 217 (1996).
- [149] R. Wada, S.H. Hyon, T. Nakamura, Y. Ikada. Pharmeol Res 8(10):1292, (1991).
- [150] M. Miyajima, A. Koshika, J. Okada, M. Ikeda. J. Control Release 60:199 (1999).
- [151] Y. Shinto, A. Uchida, F. Korkusuz, N. Avoki, K. Ono. J. Bone Jt Surg 74-B:600-4 (1992).

- [152] P. Colombo, R. Bettini, P. Santi, A. De Ascentiis, N.A. Peppas. J. Control Rel 39:231-7 (1996).
- [153] L.L. Hench, J. Am. Ceram. Soc. 74 1487, (1991).
- [154] C. Obtsuki, T. Kokubo and T. Yamuro, J. Non Cryst. Solids 143, 98 (1992).
- [155] L.L Hench and D.E. Clark. Ibid. 28, 83 (1978).
- [156] D.S. Bansal and C.G. Pantano. Non-cryst. Solids 147-148, 115 (1992).
- [157] Y. Kim, A. E. Clark and L. L. Hench, 113 (1989) 195.
- [158] "Chemical Infrared Fourier Transform Spectroscopy" Ed. T.R. Griffith John Wiley and Sons New York.
- [159] M.M. Woolfson "An Introduction to X-ray Crystallophy" Cambrige University Press 1970.
- [160] J.A. Chander "X-ray Microanalysis in the Electron Microscopy" A. M. Glauvert Ed., North-Holland Publishing company, Amsterdam (1977).
- [161] A. Armigliato, U. Valdrè "Microscopia Elettronica a Scansione e Microanalisi" Ed. centro stampa Lo Scarabeo-Bologna.